

**Der Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-
Inhibitoren auf die Leptin-induzierte
endotheliale Proliferation, Migration und auf
die Kapillarbildung in vitro im
dreidimensionalen Sphäroid-
Angiogeneseassay**

Inauguraldisseratation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nadine Ilona Stein
aus Kassel

Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Abteilung für Kardiologie und Angiologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. Erdogan
Gutachter: Prof. Dr. Kummer

Tag der Disputation: 17.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Pathophysiologische Grundlage der Arteriosklerose und die Rolle des Endothels	3
1.2 Das Hormon Leptin	5
1.3 Rolle der Cholesterinmetabolite und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren bei der Arteriosklerose	8
1.4 <i>Lipid raft</i>	12
1.5 Fragestellung	13
2 Material und Methode	14
2.1 Chemikalienliste	14
2.2 Zellkultur	15
2.2.1 Zellisolation	15
2.2.2 Zellidentifikation	16
2.2.3 Kultivierung	16
2.3 Zellproliferation	17
2.3.1 Stimulation der Zellen	17
2.3.2 Zellzählung	18
2.4 Planares Migrationsassay	18
2.4.1 Vorbereitung des Assays	19
2.4.2 Vorbereitung der Stimulationslösung	19
2.4.3 Durchführung des Assays	20
2.4.4 Auswertung	20
2.5 Dreidimensionaler Sphäroid-Angiogeneseassay	21
2.5.1 Herstellung der Methocel-Stammlösung	21
2.5.2 Herstellung der Sphäroide	22
2.5.3 Vorbereitung des Angiogeneseassays	22
2.5.4 Vorbereitung der Stimulationslösung	23
2.5.5 Start des Angiogeneseassays	23
2.5.6 Auswertung	24
2.6 Statistik	24

3	Ergebnisse	25
3.1	Zellproliferation	25
3.1.1	Einfluss von Leptin und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die endotheliale Zellproliferation	25
3.1.2	Modulation des Statin Effekts durch Metabolite des Cholesterinstoffwechsels	27
3.1.3	Einfluss von Statinen auf die Leptin-induzierte Proliferation	31
3.2	Planarer Migrationsassay	34
3.2.1	Einfluss von Leptin, Fluva-, Simvastatin auf die Migration von Endothelzellen	34
3.2.2	Modulation des Statineffekts durch Metabolite des Cholesterinstoffwechsels	35
3.2.3	Einfluss von Statinen und Cholesterinmetaboliten auf die Leptin-induzierte Migration	36
3.3	Dreidimensionaler Sphäroid-Angiogeneseassay	38
3.3.1	Einfluss der Statine auf die Leptin-induzierte Anzahl der Sphäroidsprossen	38
3.3.1.1	Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Statin-induzierte Gefäßneubildung	40
3.3.1.2	Modulation der Statin-induzierten Gefäßneubildung durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite	43
3.3.2	Einfluss von Leptin und Statinen auf die Sphäroidsprossenlänge	46
3.3.2.1	Einfluss der Cholesterinmetabolite auf das Statin-induzierte Längenwachstum	47
3.3.2.2	Modulation des Statin-induzierten Sprossenlängenwachstums durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite	50
3.3.3	Einfluss von Leptin, Cerivastatin, Fluvastatin und Simvastatin auf die kumulative Sprossenlänge (KSL) der Sphäroide	53
3.3.3.1	Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Statin-induzierte KSL	54
3.3.3.2	Modulation der Statin-induzierten KSL durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite	57

3.4	Einfluss einer membranösen Cholesterin-Depletion mittels MCD auf die endotheliale Proliferation und die <i>capillary like tube formation</i>	60
3.4.1	Einfluss von MCP auf die membranöse Proliferation	60
3.4.2	Einfluss von MCD auf die Anzahl der Sprossen	63
3.4.3	Einfluss von MCD auf die Sprossenlänge	64
3.4.4	Einfluss von MCD auf die kumulative Sprossenlänge	65
4	Diskussion	66
4.1	Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die Leptin-induzierte endotheliale Proliferation und Migration	66
4.2	Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die Leptin-induzierte <i>capillary like tube formation</i>	69
4.3	Auswirkungen der Cholesterindepletion aus der endothelialen Zellmembran	72
4.4	Klinische Aspekte und Schlussfolgerungen	73
5	Literaturverzeichnis	74
6	Anhang	80
7	Danksagung	81

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die Leptin-induzierte Proliferation und Migration humaner Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC) analysiert. Die Resultate zeigten, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren signifikant die Leptin-induzierte Proliferation und Migration inhibieren. Da dieser Effekt durch Mevalonsäure, ein Intermediat des Cholesterinstoffwechsels, aufgehoben werden kann, handelt es sich um einen spezifischen Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Die Statin-induzierte Inhibierung der Leptin-induzierten Proliferation wurde spezifisch durch Modulation der Prenylierung von Geranylgeranylpyrophosphat (GG-PP) beeinflusst. In der Leptin-induzierten Migration wurde die inhibierende Statinwirkung durch die spezifische Prenylierung von Geranylgeranylpyrophosphat (GG-PP) und Farnesylpyrophosphat (F-PP) moduliert. Durch eine Reduktion des membranösen Cholesterinspiegels der Zellen konnte nur ein deutlich schwächerer inhibitorischer Effekt hervorgerufen werden.

Zusammenfassend inhibieren HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Leptin-induzierte Proliferation und Migration durch Modulation der Prenylierung.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von Leptin und den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die *capillary like tube formation* untersucht. Während eine Leptinstimulation keine signifikanten Auswirkungen hatte, ergab eine Co-Stimulation mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren eine signifikante Steigerung der *capillary like tube formation*. Auch hierbei handelt es sich um einen spezifischen Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Während die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren ungerichtete Proliferation und Migration inhibierten, wurde durch die gleiche Dosis der Substanzen das gerichtete Wachstum von *capillary like tubes formation* durch eine Modulation der intrazelluläre Signaltransduktion verstärkt.

Summary

This study analyzed the influence of HMG-CoA-reductase inhibitors on leptin-induced proliferation and migration of human endothelial cells (HUVEC). Our results demonstrated that HMG-CoA-reductase inhibitors significantly reduce leptin-induced proliferation and migration. It is a specific effect ascribed to the HMG-CoA-reductase inhibitors, since this effect was neutralized by mevalonic acid, an intermediate product of cholesterol metabolism. HMG-CoA-reductase inhibitor induced inhibition of leptin-induced proliferation was modulated by of the prenylation of geranylgeranylpyrophosphate (GG-PP). Further, the inhibiting effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor on leptin-induced migration was modulated by the prenylation of geranylgeranylpyrophosphate (GG-PP) and farnesylpyrophosphate (F-PP). A reduction of the cellular membrane cholesterol levels achieved a markedly weaker inhibitory effect.

In summary, through modulation of prenylation, leptin induced proliferation and migration was inhibited by HMG-CoA-reductase inhibitors.

Furthermore, we investigated the effect of leptin and HMG-CoA-reductase inhibitors on *capillary like tube formation*. While stimulation with a leptin showed no significant effect, a marked increase in *capillary like tube formation* was observed with a joint stimulation with HMG-CoA-reductase inhibitors. This is a specific effect of HMG-CoA-reductase inhibitors as well. While HMG-CoA-reductase inhibitors cause inhibition of non-selective proliferation and migration, the same dose of the agents amplified the selective growth of *capillary like tubes formation* through intracellular cell modulation.

1 Einleitung

1.1 Grundlage der Arteriosklerose und die Rolle des Endothels

Arteriosklerose ist eine chronisch progrediente Veränderung der Arterienwand, die von der Tunica intima ausgeht. Die Arterienwand besteht aus drei konzentrischen Schichten, der Tunica intima, media und externa. Die Tunica intima ist die das Arterienlumen auskleidende Schicht. Sie besteht aus Endothel, einem einschichtigen Plattenepithel sowie aus einer dünnen Membran aus Kollagen und elastischen Fasern. Die Tunica elastica interna bildet den Übergang zur mittleren Schicht der Tunica media, die ihrerseits aus glatten Muskelzellen und elastischen Faserlamellen besteht. Der Übergang zur Tunica adventitia bildet die Lamina elastica externa. Die äußere Schicht, Tunica adventitia, besteht aus längs verlaufenden kollagenen und elastischen Fasern mit Fibrozyten, Mastzellen und Adipozyten, sowie Vasa vasorum. Vom Gefäßlumen ausgehend lockert sich das Bindegewebe auf und geht meist nahtlos in die angrenzenden Gewebe über [1]. Im physiologischen Zustand werden die größeren Arterien durch Vasa vasorum bis in die äußere Tunica media versorgt, wohingegen der restliche Gefäßabschnitt vom fließenden Blut durch Diffusion ernährt wird.

Unter pathologischen Bedingungen der Arteriosklerose reichen die Vasa vasorum jedoch bis in die Tunica intima. Das vegetative Nervensystem zieht durch die Tunica adventitia und endet an den Gefäßmuskelzellen der Tunica media [2].

Das Endothel besitzt endokrine, parakrine und autokrine Eigenschaften und ist in seiner Gesamtheit das größte Organ des Körpers.

Das physiologische Endothel sichert die pro- und antithrombotische Balance intravasal durch Produktion von Prostacyclin, Thrombin, von Willebrand Faktor, Protein C und Plasminogenaktivatoren. Es wirkt antiinflammatorisch, vasodilatorisch, vermindert Leukozytenadhäsionen und verringert den oxidativen Stress der Gefäßwand.

Die Hauptaufgaben von Endothelzellen sind die Regulation der Permeabilität über *tight junctions* und die Regulation des Gefäßtonus durch Ausschüttung von Mediatoren wie Endothelin, Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin und Adenosintriphosphat (ATP). Vor

allem in der Lungenstrombahn wandeln Endothelzellen durch ihr membranständiges *Angiotensin Converting Hormon* Angiotensin I in Angiotensin II um [2].

Ross definierte die *response to injury* Hypothese, nach der die Verletzung der Endothelschicht das komplexe Arteriosklerosegeschehen initiiert. Auslösende Faktoren wie Traumata, Virusinfektionen, bakterielle Toxine sowie Antigen-Antikörper-Komplexe führen zu einem Anstieg von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die eine Proliferation und Migration glatter Muskelzellen der Gefäßwand sowie die Einlagerung von Schaumzellen in Tunica intima und Tunica media auslösen [3]. Dies führt zu einer Ausbreitung der Plaque und die Arteriosklerose schreitet fort. Diese Entwicklung endet in einem stenosiertem Gefäß [4] oder einem instabilen Plaque, der bei Ruptur einen distalen Gefäßverschluss verursachen kann.

Die endotheliale Dysfunktion definiert *Furchgott* als eine Vasokonstriktion der Gefäße nach Acetylcholingabe [5].

Drexler beschreibt die endotheliale Dysfunktion als einen paradoxen Zustand von Gefäßen auf vasodilatierende Reize [6].

Faktoren, die die endotheliale Dysfunktion begünstigen, sind neben den oben aufgeführten chronischen und multifaktoriellen Prozessen, Ursachen wie Dyslipidiämie, Rauchen, Diabetes mellitus, Hypertonie, Inflammation, psychosoziale und andere immunologische Prozesse [7].

Vor allem bedingt die Dyslipidiämie mit ihrer chronischen Exposition von oxidierten *low-density Lipoprotein* (LDL) eine vermehrte Adhäsion von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten auf dem Endothel. Durch Migration gelangen die Makrophagen in den subendothelialen Raum, wo sie Cholesterin inkorporieren können und sich in Schaumzellen umwandeln. Schaumzellen und glatte Muskelzellen bilden gemeinsam *fatty-streaks*, sie sind der Ausgang der arteriosklerotischen Plaques. An solch geschädigtem Endothel haften vor allem Thrombozyten und Wachstumsfaktoren [2].

Bei *Lüscher et al.* wird folgendes Fazit gezogen: „Kardiovaskuläre Risikofaktoren lösen kardiovaskuläre Erkrankungen aus, indem sie eine Endotheldysfunktion verursachen [8].“

Die klinische Bedeutung der Arteriosklerose mit ihren Folgeerscheinungen ist weltweit die häufigste Todesursache; als Hauptmanifestationen gelten: koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrale Ischämie.

1.2 Das Hormon Leptin

Adipositas liegt ab einem Körpermassindex (BMI) von 30 kg/m^2 vor und nimmt in den westlichen Industriestaaten immer mehr den Charakter einer Volkskrankheit an [9], [10]. Die Auswirkungen von Adipositas auf kardiovaskuläre Erkrankungen mit ihren Komplikationen werden in dieser Arbeit näher beleuchtet. Übergewicht und die damit bedingte Körperfettzunahme provozieren Stoffwechselstörungen wie Insulinresistenz und erhöhte Serumlipide, welche Arteriosklerose begünstigen [11], [12].

Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ, es produziert und sezerniert Mediatoren, die auf Arteriosklerose Einfluss nehmen können. Die Menge des körperlichen Fettgewebes korreliert positiv mit der Höhe der Mediatoren, die vom Fettgewebe produziert werden [13], [14].

Das Proteohormon Leptin, ein Sekretionsprodukt des Fettgewebes, wurde 1994 von dem Molekularbiologen *Jeffrey Friedman* entdeckt [15] und ist auf dem *obese-gen* kodiert. Hauptsächlich wird Leptin von Adipozyten exprimiert und sezerniert, besonders während aktivierter Lipogenese. Unter anderem wird das Proteohormon auch in Placenta, Ovarien, Skelettmuskel, Gehirn, Leber und Magenmucosa synthetisiert [16], [17].

Bei Leptin zeigt sich ein Geschlechtsdimorphismus, d. h. Unterschiede, die sich im Erscheinungsbild von männlichen und weiblichen Individuen der gleichen Art darstellen. Die Höhe des intravasalen Leptinlevels korreliert im menschlichen Körper mit der Fettmasse. Bei gleicher Fettmasse ist der Leptinlevel bei Frauen deutlich höher als bei Männern [18], [19].

Der OB-Rs ist die lösliche Version des stimulierten Leptinrezeptors und dient dem Leptintransport über die Blut-Hirn-Schranke. Wird dieser stimuliert, wirkt Leptin

neuroendokrin am Hypothalamus als Sättigungshormon [13], [20]. In einer Fastenphase ist der Leptinspiegel verringert und steigt bei Nahrungsaufnahme an.

Die im Blut zirkulierende Leptinkonzentration korreliert positiv mit dem BMI [21], [22]. Adipositaspatienten haben einen zu ihrer Fettmasse proportional erhöhten Leptinspiegel. Hierbei verspüren sie keine Abnahme des Hungergefühls, sondern entwickeln stattdessen eine zentrale Leptin-Resistenz [23]. Somit ist eine der wichtigsten Funktionen von Leptin die Regulation des Körpergewichts.

Im kardiovaskulären Kontext hat das Proteohormon noch weitere Funktionen: Auswirkungen auf die vaskuläre Verkalkung [24], Förderung der Angiogenese [25], Beeinträchtigung des arteriellen Gefäßtonus [25], Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen [26] und Auswirkungen auf Gefäßtonus und Blutdruck [27].

In dieser Arbeit wird besonders die Rolle von Leptin im Zusammenhang mit dem Endothel untersucht. Experimente an den *Ob/ob*-Mäusen belegen diesen Zusammenhang. *Ob/ob-Mäuse* weisen eine Mutation des Leptingens auf. Sie können kein Leptin produzieren, fressen exzessiv und werden adipös. *Schäfer et al.* erkannte in spezifischen Versuchen, dass in *ob/ob-Mäusen* erhöhte Leptinkonzentrationen die Intimaneubildungen und die Lumeneinengung nach arterieller Verletzung *in vivo* fördern [28].

Zusätzliche Untersuchungen ergaben, dass Leptin nicht nur an Arterienwandverdickungen beteiligt ist, sondern auch die Gefäßwanddehnung sowie den C-reaktiven Protein (CRP)-Anstieg beeinflusst [29].

Leptinrezeptoren befinden sich nicht nur auf Endothelzellen [30], sondern auch auf Thrombozyten. An ihnen regt Leptin die Plättchenaggregation an und fördert auf diesem Wege die arterielle Thrombose [31], [32], [33]. Zusätzlich induziert das Proteohormon auch vaskuläre Entzündung [34], [35], Proliferation, endotheliale Dysfunktion [36], Kalzifikation und Erhöhung des oxidativen Stresses [29], [37], [38]. Leptin stimuliert zudem das sympathische Nervensystem und sorgt damit für eine Erhöhung des diastolischen Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Thermogenese (Wärmebildung durch Stoffwechselaktivität) [39].

Besonders die *West of Scotland Coronary Prevention Study* (WOSCOPS) beschrieb 2001 zum ersten Mal Leptin als unabhängigen Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten [40]. Eine schwedische Studie ergab 1999, dass hohe Cholesterin- und Leptinwerte im Serum ein signifikantes Risiko für akute Myokardinfarkte darstellen

[41]. Zusammenfassend kann man feststellen, dass die endotheliale Dysfunktion durch Leptin gesteigert wird [36].

Die Fähigkeit zur Bildung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen ist eine wichtige Funktion von Endothelzellen, die unter physiologischen Bedingungen in der Embryonalentwicklung und Wundheilung abläuft. Diese Funktion spielt zudem auch unter pathophysiologischen Bedingungen wie bei der diabetischen Retinopathie, dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren sowie bei der Arteriosklerose eine Rolle.

Dass durch Leptin eine Endothelzellproliferation erreicht wird, wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe *in vitro* untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass Leptin eine Hyperpolarisation der endothelialen Zellmembran verursacht und damit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies fördert, die ihrerseits die endotheliale Proliferation steigern [42].

Auch andere Studien ergaben, dass Leptin die Proliferation von Endothelzellen fördert [43]. Neuere Studien zeigten, dass auch die Migration von Endothelzellen durch hohe Leptinkonzentrationen stimuliert wird [44].

1.3 Rolle der Cholesterinbiosynthesemetabolite und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren bei der Arteriosklerose

Cholesterin ist ein lebenswichtiges Lipid. Als ein essentieller Bestandteil von zellulären Membranen verstärkt es deren Stabilität. Im Blut wird es an Lipoproteine gebunden und ist eine Vorstufe von Gallensäuren und Steroidhormonen. Zellen der Leber und Darmschleimhaut sind in der Lage, Cholesterin zu synthetisieren.

Ausgangsmetabolit der Cholesterinbiosynthese ist die aktivierte Essigsäure, das Acetyl-CoA. Die intrazelluläre Synthese wird durch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) gesteuert, sie katalysiert die Synthese von Mevalonat, einem Cholesterinvorläufer. Nachdem in der Cholesterinbiosynthese Mevalonat entsteht, folgen die Isoprenoide Geranylpyrophosphat (G-PP) und Farnesylpyrophosphat (F-PP). Von F-PP abzweigend entsteht Geranylgeranylpyrophosphat (GG-PP) [45] (Abb. 1).

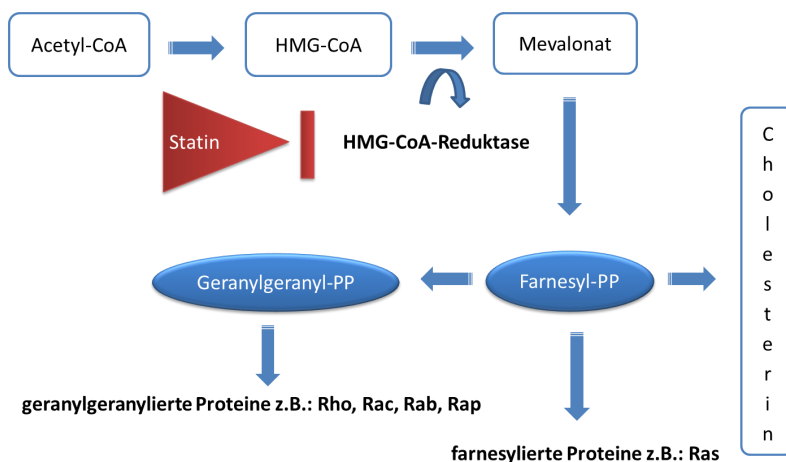


Abb.1: **Die Rolle von Statinen in der Cholesterinbiosynthese**

(in Anlehnung an [medscape.com/.../158/pharm552158.fig1.gif](https://www.medscape.com/.../158/pharm552158.fig1.gif))

In dieser Arbeit wird die Bedeutung dieser Metabolite für die Modulation durch Statine der Leptin-induzierten Arteriosklerose weiter untersucht.

Erhöhte Plasmakonzentrationen von Cholesterin, vor allem von LDL-Cholesterin, spielen in der Pathogenese von Arteriosklerose eine wesentliche Rolle. Das Risiko an einer koronaren Arteriosklerose zu erkranken, korreliert negativ mit der Höhe des *high-density lipoprotein* (HDL)-Cholesterins [46].

Eine wirksame lipidsenkende Therapie kann die Progression der Arteriosklerose hemmen; bei der Hypercholesterinämie ist die Senkung der exogenen Fettzufuhr der erste Schritt.

Pharmakologisch sind für Erwachsene HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) verfügbar. Hierbei wird das geschwindigkeitsbestimmende Enzym, die HMG-CoA-Reduktase, intrazellulär kompetitiv gehemmt. Hierdurch ist eine vollständige Inhibition der Cholesterin- und Isoprensynthese durch die hohe Affinität der Statine zur HMG-CoA-Reduktase verantwortlich. Somit wird ein intrazellulärer Cholesterinmangel induziert, der zu einer gesteigerten Transkription des LDL-Rezeptor-Gens und der mRNA der HMG-CoA-Reduktase führt. Dies verursacht eine gesteigerte Aufnahme von LDL-Cholesterin, um den intrazellulären Cholesterinbedarf zu decken [47].

Statine hemmen nicht nur die Entstehung von Mevalonat, sie unterbinden auch den Anabolismus von weiteren Zwischenprodukten der Cholesterinbiosynthese. Dazu gehören vor allem die Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (F-PP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GG-PP). Diese Proteine spielen vor allem bei zellulären Regulationsvorgängen eine wichtige Rolle, sie prenylieren posttranslational intrazelluläre Proteine. Hierdurch werden deren Aktivitätszustand und die Funktionalität einer Zelle beeinflusst. Durch diese hydrophobe Prenylierung werden viele Proteine dazu befähigt, Bestandteil von Zellmembranen zu werden [48],[49].

Zu diesen prenylierten Proteinen zählen Guanosintriphosphat (GTP)asen (Ras, Rho, Rac, Rab und Rap), kleine Proteine, die eine alternierende Bildung zu Guanosindiphosphat (GDP) und GTP eingehen können und durch ihre Bindung eine Aktivierung oder Deaktivierung dieser Nukleotide auslösen [50]. Beispielsweise führt Farnesylpyrophosphat zur Prenylierung von Ras und Geranylgeranylpyrophosphat zur Prenylierung von Rho, Rac, Rab und Rap [51]. Ras-GTPasen beeinflussen verschiedene Signaltransduktionswege, Wachstums- und Differenzierungsprozesse [52]. Im Vergleich dazu regulieren Rho-GTPasen die Migration und Proliferation von Zellen, beteiligen sich an der Strukturierung des Zytoskeletts und der Signaltransduktion [50],

[51], [53]. Des Weiteren reguliert Rho-GTPase verschiedene Genexpressionen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass RhoA die „endotheliale NO-Synthase (eNOS)-Expression in endothelialen Zellen durch Destabilisierung der eNOS mRNA unterdrückt“ [54]. Die eNOS synthetisiert Stickstoffmonoxid (NO), welches einen vasodilatierenden und vasoprotektiven Effekt auf das Endothel ausübt. Statine fördern durch die Reduktion der Rho-Synthese die NO-Produktion. Wird die Rho-Kaskade durch Statine gehemmt, entsteht eine Akkumulierung von inaktiven Rho innerhalb des Zytoplasmas [55].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren kardiovaskuläre Ereignisse wie die koronare Herzkrankheit, den Apoplex und die Hypercholesterinämie reduzieren können [56], [57].

Die Statineffekte können einerseits den Lipidstoffwechsel beeinflussen (Hemmung der Cholesterinsynthese, erhöhte Aufnahme und Abbau von LDL und Inhibition der Lipoproteinsekretion) und andererseits zelluläre Signaltransduktionen modulieren. Diese Signaltransduktionen beeinflussen u. a. direkt die endotheliale Funktion durch erhöhte NO-Produktion, Förderung der Heilungstendenz nach Gefäßverletzung, Erhöhung der Plaquestabilität und unterdrücken inflammatorischer Prozesse [58], [59]. Die zusätzlichen nichtlipidsenkenden Wirkungen von Statinen werden als pleiotrop bezeichnet [60], [61], [62].

Die *4S-Studie*, eine klinische Interventionsstudie, war ein Meilenstein in der Sekundärprävention bei kardiovaskulären Ereignissen. Nach dem erstmaligen Auftreten eines Koronaren Herzkrankheits (KHK)-Ereignisses bei Hoch-Risiko-Patienten wurden sie in dieser Studie anschließend präventiv mit der Gabe von Simvastatin behandelt, um darauf folgende Ereignisse zu reduzieren. Diese Studie zeigte erstmals eine Senkung der Gesamtmortalität durch die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren-Therapie [63]. Mittlerweile ist die Wichtigkeit der Senkung des LDL-Plasmaspiegels durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren bei KHK-Patienten in Primär- und Sekundärprävention weltweit unbestritten [64].

Die Schweizer *CARE Studie* von *Rutishauser et al.* führte eine Pravastatinbehandlung an Patienten, die bereits einen Myokardinfarkt hatten, mit normalen bis mäßig erhöhten Cholesterinwerten (150 - 174 mg/dl) durch und registrierte unter dieser Statintherapie eine signifikante Senkung tödlicher KHK-Ereignisse von 24% [65].

Statine sind in der Lage, die endotheliale Zellproliferation zu reduzieren, indem sie den Lysophosphatidylcholine (LPC)-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg hemmen [66], der für den endothelialen Zellzyklus von Bedeutung ist [67].

Der antiproliferative Effekt von Statinen kann durch Mevalonat wieder aufgehoben werden. Nicht nur der Cholesterinbiosynthese-Metabolit Mevalonat reduziert den Statin-Effekt, sondern auch die Metabolite GG-PP und F-PP [68], [69].

Interessanterweise haben Statine nicht nur gleichgerichtet hemmende Wirkungen auf das endotheliale Zellwachstum, sie verursachen konzentrationsabhängig auch völlig entgegengesetzte Wirkungen, in denen sie endotheliales Zellwachstum fördern [70].

Die folgenden Experimente versuchen, diese Zusammenhänge, insbesondere die ambivalente Statinwirkung im arteriosklerotischen Kontext, näher zu veranschaulichen.

1.4

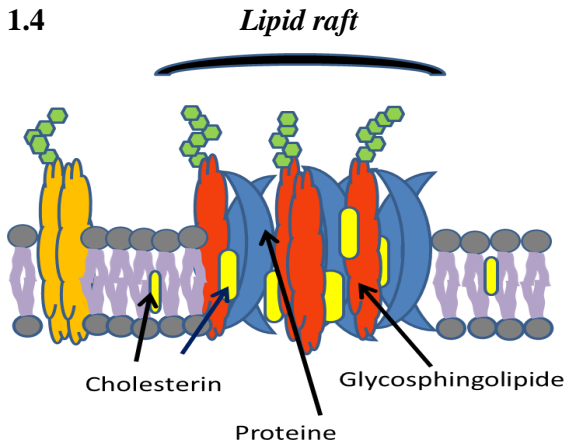


Abb. 2: Lipid raft

(modifiziert nach http://en.wikibooks.org/wiki/File:Lipid_Raft*.png)

Erstmalig wurde die Hypothese der Existenz von *lipid rafts* (engl. Floß) 1988 von *Simons und van Meer* geäußert [71]. Sie sind als cholesterinreiche Mikrodomänen in Zellmembranen beschrieben, bestehen aus Glyco- und Sphingolipiden, Cholesterin und Proteinen (Abb. 2).

Caveolen sind Untergruppen von *lipid rafts*, ihre Größe hängt vor allem von der Proteinverteilung ab und wird mit einem Mittelwert von 50 nm angegeben; sie sind oft mit Proteinen, deren Lipidanker in der Zellmembran verankert ist, assoziiert.

Mit anderen Membrandomänen regulieren *lipid rafts* Funktionen in eukaryoten Zellen. In Endothelzellen regulieren sie Transzytose, Signaltransduktion und können Krankheitserregern als Eintrittspforten dienen [72], [73], [74].

Diese dynamischen Einheiten stabilisieren die Sphingolipiddoppelschicht der Zellmembran und stellen feste Plattformen dar, sind in der Lage sich jedoch auch in fließenden Bewegungen wieder zu trennen. Als besonderes Bindeglied dieses dynamischen Prozesses fungiert Cholesterin. Es dient als Abstandshalter von Sphingolipiden und hält das funktionsbereite Floß zusammen [73]. Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) ist ein cholesterinbindendes Oligosaccharid, das zirkulär angeordnet ist und in seiner Mitte Cholesterin bindet. MCD kann als Hemmstoff für die Bildung von *lipid rafts* verwendet werden [75].

In dieser Arbeit wird die Funktion der endothelialen *lipid rafts* in Zusammenhang mit den hiesigen Leptin-induzierten Versuchsreihen gebracht, um weitere Erkenntnisse über die Lage des Leptinrezeptors in der endothelialen Zellmembran zu gewinnen.

Insbesondere sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1.5 Fragestellung

1.: Beeinflussen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren das Leptin-induzierte Migrations- und Proliferationsverhalten von Endothelzellen? Wenn Statine dies beeinflussen, auf welcher Ebene der Cholesterinbiosynthese findet dieser Effekt dann statt und ist der Effekt auf die Migration und Proliferation gleich?

2.: Wenn HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Migration und Proliferation beeinflussen, welchen Einfluss haben sie dann auf die *capillary like tube formation*? Wie sind die Ergebnisse im Vergleich zu den Resultaten aus Proliferation und Migration zu interpretieren?

3.: Ist der Einfluss der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf eine Modulation der Signaltransduktion zurückzuführen oder wird er durch Reduktion des membranösen Cholesterinspiegels hervorgerufen?

2 Material und Methode

2.1 Chemikalienliste

Leptin, Mevalonat, Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GG-PP), Farnesyl-Pyrophosphat (F-PP), Methyl- β -Cyclodextrin (MCD): (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Endothelial Basal Medium: (EBM, Prom Cell, Heidelberg, Deutschland)
Fetales Kälber Serum: (FKS, PAA, Linz, Österreich)
Gelantine: (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Gentamycin: (Prom Cell, Heidelberg, Deutschland)
Cerivastatin: (Bayer, Deutschland)
Fluvastatin, Simvastatin: (Calbiochem, USA)
Hank's balanced salt solution HBSS: (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich)
Methylcellulose: (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
Kollagenaselösung: (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
NaOH: (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Trypsin: (Linz, Österreich)
Essigsäure: (Darmstadt, Deutschland)
Kollagen: BD Biosciences (San Jose, USA)
ECGS/H, Epidermal Growth Factor, Hydrocortison, basic Fibroblast Factor, Amphotericin, Gentamycin: (PAA, Linz, Österreich)
Paraformaldehydlösung: (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
M199: (Sigma, Taufkirchen, Germany; one vol.)

2.2 Zellkultur

Aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC) wurden Endothelzellen nach der Methode von *Jaffe et al.* isoliert, identifiziert und kultiviert [111]. Dieses Verfahren wird in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

2.2.1 Zellisolation

Nach der Abnabelung wurden die Nabelschnüre direkt in ein steriles Gefäß gelegt und anschließend mit einer sterilen Kompresse gereinigt. Danach wurden die Nabelschnüre auf Verletzungen untersucht. Mit einer Knopfkanüle wurde die Nabelschnurvene aufgesucht und zweimal mit 50 ml HBSS (PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich) durchgespült.

Erwies sich die Vene bei diesem Vorgang als durchgängig, wurde sie am anderen Ende abgeklippt. Daraufhin wurde die Vene mit 0,025% Kollagenase-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefüllt und bei 37 °C für 20 min im Brutschrank inkubiert, um die humanen Endothelzellen (HUVEC) aus ihrem Zellverband zu lösen. Derzeit wurde in ein 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson, USA) 1 ml fetale Kälberserum (FKS; PAA, Linz, Österreich) pipettiert. Nach Inkubation der mit Kollagenase gefüllten Nabelschnurvene wurde sie mit 30 ml HEPES gespült. Die Spüllösung mit den darin gelösten Endothelzellen wurde in den vorbereiteten Röhrchen aufgefangen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der sich dabei entwickelte Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml *Endothelial Basal Medium* (EBM; Prom Cell, Heidelberg, Deutschland) zusätzlich folgender Aliquots (alle Promo Cell, Heidelberg, Deutschland): 0,4% ECGS/H, *Epidermal Growth Factor* 0,1 ng/ml, Hydrocortison 2 µg/ml, basic Fibroblast Factor 1 ng/ml; Amphotericin 50 ng/ml, Gentamycin 50 µg/ml und 20% FKS (PAA, Linz, Österreich) versetzt und resuspendiert.

Abschließend wurden die Zellen auf 25 cm² Plastik Kulturschälchen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät, die mit 0,2% Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) vorbeschichtet waren.

2.2.2 Zellidentifikation

Um die Zellen als Endothelzellen zu identifizieren, wurde deren Morphologie lichtmikroskopisch beurteilt.

Das *Cobblestone-Phänomen* hilft zur lichtmikroskopischen Identifikation, es beschreibt einen kopfsteinpflasterartig angeordneten Monolayer der Endothelzellen, wobei hingegen Fibroblasten oder glatte Muskelzellen sich als spindelförmige Zellen imponieren, die sich gegenseitig überlappen und sich nicht im Zellverband als Monolayer darstellen.

2.2.3 Kultivierung

Die HUVEC wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert, dabei wachsen sie in einem einschichtigen Zellverband (Monolayer). Nachdem der Monolayer vollständig ausgebildet war, konnten diese Zellen aus der Primärkultur in mit Gelatine vorbeschichtete Plastikflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt werden. Dem Nährmedium (Prom Cell, Heidelberg, Deutschland) wurden nur 10% FKS zugegeben. Des Weiteren wurde auf die Zugabe von Amphotericin B verzichtet. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Sobald die Zellen in der Kulturflasche konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen passagiert. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden sie zwei Minuten mit Trypsin EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert. Die erfolgreiche Ablösung der Zellen wurde mit dem Lichtmikroskop überprüft und durch die Trypsinierung gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Nährmedium resuspendiert. Nun wurden die Zellen in frischen, mit 0,2% Gelatine vorbeschichteten Kulturflaschen mit einer Dichte von 3000/cm² ausgesät.

Täglich wurden die Zellmorphologie und das Wachstum der Zellen mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. Falls Bakterien oder Pilze die Kulturgefäße kontaminierten, konnten sie rasch erkannt und entfernt werden.

2.3 Zellproliferation

2.3.1 Stimulation der Zellen

Der Einfluss von Leptin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) auf das Proliferationsverhalten von HUVEC wurde durch die Bestimmung der Zellzahl untersucht. Weitere Kostimulatoren waren Cerivastatin (Bayer, Deutschland), Fluvastatin (Calbiochem, USA), Simvastatin (Calbiochem, USA), Mevalonat, Geranyl, Farnesyl und MCD (Methyl- β -Cyclodextrin) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Zunächst wurde untersucht, ob Leptin einen Proliferationseffekt auf die Endothelzellen ergab. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in einer steigenden Stimulationsreihe mit Leptin (Kontrolle; 4 ng/ml; 8 ng/ml; 12 ng/ml; 20 ng/ml; 40 ng/ml; 80 ng/ml; 120 ng/ml) stimuliert. Die Stimulationslösung von Leptin erfolgte in einer Badlösung. Diese setzt sich wie folgt zusammen: 140 mmol/l NaCl; 5,5 ng/ml D-Glucose; 10 mmol/l HEPES; 5mmol/l KCl; 0,5 mmol/l MgCl₂ 1,5 mmol/l CaCl₂; pH 7,3 (justiert durch die Zugabe von NaOH).

Danach wurde die Wirkung von den Statinen untersucht: Cerivastatin (1 μ l/ml), Fluvastatin (2 μ l/ml) und Simvastatin (2 μ l/ml) mit und ohne die Zugabe von Leptin (8 ng/ml) im Proliferationsverhalten.

Um zu erkennen, wie Leptin mit dem Cholesterinbiosyntheseweg zusammenhing, gaben wir folgende Metabolite (Mevalonat: 5 μ l/ml, Farnesyl: 4,34 μ l/ml und Geranyl: 5 μ l/ml) der Cholesterinbiosynthese hinzu, auch bei diesen Stimulationen wurden die oben genannten Statine miteinbezogen. Abschließend wurde untersucht, ob MCD (100 μ l/ml) in einem Zusammenhang der durch Leptin induzierten Proliferation von Endothelzellen steht.

Alle genannten Substanzen konnten direkt in entsprechender Konzentration in die Zellsuspension hinzugefügt werden, bis auf MCD. Die mit MCD stimulierten Endothelzellen wurden eine halbe Stunde inkubiert und anschließend wurde die Stimulationslösung abgesaugt. Daraufhin wurden die Endothelzellen mit den jeweiligen Kostimulation über 48 h inkubiert und abschließend ausgewertet.

2.3.2 Zellzählung

Per Zellzählung wurde die Proliferation der Endothelzellen untersucht. Dafür wurden mit Gelatine vorbeschichtete 12-Well-Platten (Becton Dickinson, USA) verwendet. In jedes Well wurden 5000 Zellen in 1 ml EBM mit 10% FCS ausgesät (Tag 0). Nach 24 h (Tag 1) wurde das Medium gegen FKS-freies EBM gewechselt. So sollte eine Synchronisation des Zellzyklus erreicht werden. Nach weiteren 24 h (Tag 2) erfolgte ein Austausch auf 2%-FKS-haltiges EBM und die Stimulation der Zellen mit den Konzentrationen, wie in 2.3.1 angegeben. Nach weiteren 24 h (Tag 3) wurden die Zellen abschließend gezählt.

Die Zellen wurden eine Minute mit Trypsin-EDTA inkubiert, damit sie sich vom Boden der Vertiefung lösten. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer die Zellzahl bestimmt. Für jedes Well wurde die Zellzahl vierfach bestimmt und anschließend der Mittelwert gebildet.

2.4 Planarer Migrationsassay

Zur Untersuchung der Migration endothelialer Zellen wurde eine Methode eingesetzt, in der Silikonquader in 12-Well-Platten einen zentralen zellfreien Spalt erzeugen. Mit dem planaren Migrationsassay wurde die Modulation der Leptin-induzierten Migration von HUVEC durch Statine untersucht. Hierbei wurden die aufeinander zuwachsenden Zellgrenzen der unterschiedlichen Stimulationsmedien bestimmt.

Bei diesem Assay wird der Abstand zweier aufeinander zugerichteter Migrationsfronten mit einem geeichten und skalierten Mikroskop bestimmt.

2.4.1 Vorbereitung des Assays

Silikonquader (FlexiPERM) wurden zunächst in ungefähr gleichgroße Blöcke geschnitten und in 70%igen Alkohol aufbewahrt. Nach fünf Stunden wurden sie mit einer sterilen Pinzette auf sterile Petrischalen überführt, um dort zehn bis zwölf Stunden zu trocknen. Danach wurden ein steriler Silikoneinsatz mittig in das jeweilige Well einer 12-Well-Platte mit leichtem Druck eingesetzt.

Anschließend wurde die Kulturplatte kontrolliert. Waren dann die Endothelzellen konfluent gewachsen, wurde der Überstand abgesaugt. Danach wurde der Zellboden zweimal mit 10 ml *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, PAA, Laboratories GmbH Pasching, Österreich) gewaschen. Die Lösung der Endothelzellen erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), welches eine Minute inkubiert wurde. Nach Zählung der Zellen wurde eine Zelldichte von 200.000 Zellen/ml Wachstumsmedium (10%iges EBM) hergestellt. Abschließend wurde 1 ml dieser Zellsuspension pro vorbereitetes Well ausgesät und diese über Nacht inkubiert.

2.4.2 Vorbereitung der Stimulationslösung

Zur Bestimmung des Migrationsverhaltens von Endothelzellen wurden Leptin: 8 ng/ml (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), sowie Simvastatin: 2 µl/ml, Fluvastatin: 2 µl/ml (Calbiochem, USA), Mevalonat: 5 µl/ml, Geranyl: 5 µl/ml und Farnesyl: 4,34 µl/ml (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Die Basis dieses Stimulationsmediums bildete EBM (Zusammensetzung siehe 2.1.1) mit 2% FKS.

2.4.3 Durchführung des Assays

Beim Start des Assays sollten die Endothelzellen einen konfluenten Monolayer gebildet haben, der Silikonblock sollte homogen und dicht von Endothelzellen umschlossen sein. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Silikonblöcke steril und schnell senkrecht nach oben herausgezogen. Nun konnten die Endothelzellen in die von den Silikonblöcken zuvor freigehaltenen Bereiche hinein migrieren. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit HBSS gewaschen. Danach wurde 500 µl/Well Stimulationsmedium hinzugefügt.

Anschließend wurde im Lichtmikroskop der Ausgangswert der Migration bestimmt. Im Lichtmikroskop befand sich in einem Okular eine Skalierung, hiermit konnte der Abstand zwischen den beiden Migrationsfronten an drei verschiedenen Stellen gemessen werden.

Die Stimulationsplatten wurden nach der Ausgangswertbestimmung 48 h inkubiert.

2.4.4 Auswertung

Zur Bestimmung der Migrationsdistanz wurde mit einem skalierten Mikroskop der in jedem Well verbleibende Abstand ermittelt. Ausgangsmessungen (A) des Spalts wurden direkt nach dem Entfernen des Silikonquaders erhoben und nach 48 h stimulierter Inkubation wurde eine erneute Messung des Spalts zur Ermittlung der Ergebniswerte durchgeführt (E). Diese Messungen wurden jeweils an drei unterschiedlichen Stellen der Migrationsfronten gemessen. Die Summe der Ausgangswerte (A) wurde von der Summe der Ergebniswerte (E) subtrahiert und durch zwei dividiert, da es sich um zwei Migrationsfronten handelte, die sich aufeinander zu bewegten.

$$((A1+A2+A3)/3)-((E1+E2+E3)/3)/2 = \text{Migration}$$

2.5 Dreidimensionaler Sphäroid-Angiogeneseassay

Die Sphäroide wurden nach einem modifizierten Protokoll nach *Kroff et al.* [76] hergestellt. Dieser dreidimensionale Angiogeneseassay wurde in physiologischen Matrices (Kollagen, Fibrin) aus HUVEC hergestellt. Das dreidimensionale *in vitro* Sprouting Angiogenese Model basiert auf der Endothelzellfähigkeit, in einem dreidimensionalen Substrat (z.B. Matrigel, Kollagenkegel) gefäßähnliche Strukturen (*capillary like tube formation*) zu entwickeln.

Am Ende des Assays waren die vom Sphäroid ausgehenden Sprossen gut sichtbar, so dass die Sprossenintensität ermittelt werden konnte. Unter dem Lichtmikroskop wurden drei unterschiedliche Kriterien der stimulierten Sphäroide beurteilt. Zunächst wurde die Anzahl der aus ihnen entstandenen einzelnen Sprossen verglichen, anschließend die durchschnittlichen Sprossenlängen und abschließend die kumulativen Sprossenlängen.

2.5.1 Herstellung der Methocel-Stammlösung

Die beim Sphäroidassay verwendeten Medien enthielten eine 20% Methylcelluloselösung, deren Herstellung kurz erläutert wird:

Sechs Gramm Methylzellulose (Sigma, Diesenhofen, Deutschland) wurden zusammen mit einem sauberen Magnetprüher in eine 500 ml Schott-Flasche gegeben und autoklaviert. 500 ml Medium (EBM; Prom Cell, Heidelberg, Deutschland) wurden in 2 x 250 ml aufgeteilt. Danach wurde eine Flasche mit 250 ml Kulturmedium (EBM; Prom Cell, Heidelberg, Deutschland) ohne Zusätze auf Raumtemperatur gebracht und die andere Flasche mit 250 ml Medium wurde kurzfristig auf 60 °C erwärmt.

Bei Raumtemperatur wurde dem Kulturmedium so viel Gentamycin und Amphotericin B zugesetzt, dass die finale Konzentration in 500 ml später bei 50 µg/ml lag. Dem 250 ml angewärmten Kulturmedium, das kurzzeitig bei 60 °C erwärmt wurde, wurde die autoklavierte Methylzellulose hinzugeführt, und es wurde mit dem Magnetprüher für 20 min bei Raumtemperatur gerührt, so dass sich die gesamte Methylzellulose ohne Klumpenbildung in Suspension befand. Abschließend wurde in diese Suspension das restliche, sich auf Raumtemperatur befindliche, Kulturmedium zugesetzt und über

Nacht bei 4 °C geführt. Es entstand nun ein leicht trübes, geleeartiges Medium, welches auf 50 ml Gefäßen verteilt wurde und bei 5000 UPM für zwei Stunden bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde.

Von dem nun erlangten Überstand konnten 45 ml als Methocel-Stammlösung verwendet werden, die Aufbewahrung des Aliquots geschah bei 4 °C.

2.5.2 Herstellung der Sphäroide

Die folgende Anleitung der Sphäroide bezieht sich auf die Herstellung von 4 x 96 Sphäroiden, wobei jedes Sphäroid 400 Endothelzellen enthält.

Dabei wurden konfluente Endothelzellen mit Trypsin vom Kulturgefäß abgelöst und per Zentrifugation sedimentiert. Danach wurde die definierte Anzahl der HUVEC in einer Mischung aus 80% normalem Kulturmedium und 20% Methylozellulose-Stammlösung resuspendiert (nach Zählung 400 Zellen pro 100 µl/ml). Jeweils 100 µl/ml dieser Zellsuspension wurden mit Hilfe einer geeigneten Mehrkanalpipette in 96-Well-Platten verteilt und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit sollte sich ein nahezu rundes Sphäroid (Zellagglomerat) pro Well ausgebildet haben.

2.5.3 Vorbereitung des Angiogeneseassays

Nach 24 h wurden die Sphäroide mit einer Pipette sorgfältig geerntet und in 50 ml Röhrchen überführt. 2 - 3 min wurden dann jeweils 50 Sphäroide bei 1000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert und somit sedimentiert, der entstandene Überstand wurde abgesaugt. Das dabei entstandene Sphäroidsediment wird durch Schaben des Gefäßes über einen holprigen Untergrund gelockert. Diese wurden folgendermaßen in Kollagen eingebettet: Zunächst wurde als erstes über die gewonnenen Sphäroide 4,5 ml Medium, bestehend aus 40% FKS und 60% Methylcellulose-Stammlösung gegeben. In einem weiteren Gefäß wurden 0,5 ml eines 10x Medium (M199) sorgfältig mit 4 ml Kollagen-Stammlösung auf Eis gemischt. Diesem Gemisch wurde vorsichtig ca. 0,5 ml kalte 0,2

M Natriumhydroxidlösung tröpfchenweise zugegeben, um den pH auf 7,4 einzustellen. Anschließend wurde die neutralisierte Kollagenlösung mit der Sphäroidsuspension gemischt, diese Mischung wurde in vorgewärmte 24-Well-Platte gleichmäßig in acht innere Wells mit 1 ml je Well gefüllt, wobei die äußeren Wells mit 1 ml sterilen HBSS gefüllt waren. Daraufhin wurden die 24-Well-Platten zügig für 30 min in den Brutschrank gestellt und anschließend konnte die Stimulation beginnen.

2.5.4 Vorbereitung der Stimulationslösung

Um herauszufinden, wie die Leptin-induzierte *capillary like tube formation* durch die Statine moduliert wird, wurden die Sphäroidexperimente mit den hier verwendeten Konzentrationen durchgeführt. Hierbei wurden 100 µl Medium mit Cerivastatin (1 µl/ml), Fluvastatin (2 µl/ml) und Simvastatin (2 µl/ml), mit und ohne die Zugabe von Leptin (8 ng/ml), sowie Mevalonat (5 µl/ml), Farnesyl (4,34 µl/ml) und Geranyl (5 µl/ml) pro Well vermischt.

2.5.5 Start des Angiogeneseassays

Nach der Zugabe der Stimulationssubstanzen durch mittige Pepittierung pro Well, wurden die 24-Well-Platten im Brutschrank für 12 - 24 h inkubiert und anschließend wurden die Gele für 1 h mit 1 ml 10%ige Paraformaldehydlösung pro Well gestoppt.

2.5.6 Auswertung

Um Sphäroide auswerten zu können, mussten sie folgende Kriterien erfüllen: Zum einen durften sie nicht an den Grenzzonen liegen, da dann die gleichmäßige Sprossung verhindert worden wäre. Des Weiteren durften sie nicht direkt nebeneinander liegen und nicht direkt neben einem Gasbläschen, da so eine genaue Auswertung nicht möglich wäre.

Anschließend wurden die Gele mit einem Lichtmikroskop untersucht und die Anzahl, Länge und die kumulative Länge der *capillary like tube formation* festgestellt. Jeweils ein Mittelwert wurde aus 10 Sphäroiden gebildet.

2.6 Statistik

Die erhobenen Daten wurden grundsätzlich aus den Mittelwerten mehrerer Messreihen gebildet, die mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden. Der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) ist immer angegeben. Zum statistischen Vergleich der Sprouting-, Migrations- und Proliferationmessungen wurde die T-Test Datenanalyse durchgeführt. Ein Niveau von $p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS (Fa. SPSS Inc., Columbia, USA) für Windows (Version XP). Die graphische Ausarbeitung der Messergebnisse erfolgte mit dem Diagrammassistenten des MS Excel-Programms.

3 Ergebnisse

3.1 Zellproliferation

3.1.1 Einfluss von Leptin und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die endotheliale Zellproliferation

Zuerst wurde die Wirkung von Leptin auf die endotheliale Proliferation überprüft. Dazu wurde eine Leptinkonzentration von 8 ng/ml ($n = 32$, $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe) verwendet, durch die es zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl auf 117,6% gegenüber der Kontrollgruppe kam. Vorversuche meiner Arbeitsgruppe erreichten bei einer Dosis von 8 ng/ml Leptin die maximale proliferative Wirkung von Leptin. Daraufhin wurden alle Versuche in den folgenden Experimenten mit dieser Leptinkonzentration durchgeführt. Durch die Kostimulation von Leptin und Cerivastatin konnte das Zellwachstum auf 8,6% signifikant inhibiert werden. Auch die Zugabe von Cerivastatin führte zu einer signifikanten Hemmung auf 2,3%.

Fluvastatin und Simvastatin konnten die Leptin-induzierte Proliferation ebenfalls signifikant inhibieren. Auf Grund der im Vergleich mit Simva- und Fluvastatin deutlich höheren antiproliferativen Wirkung von Cerivastatin wurde es bei den Experimenten nur in einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt, während für Fluvastatin und Simvastatin, um eine ähnlich antiproliferative Wirkung zu erreichen, eine Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ erforderlich war.

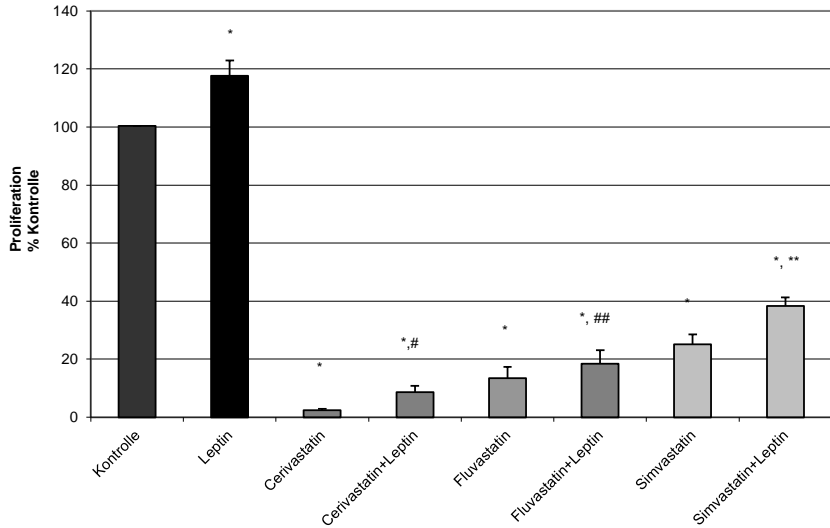


Abb. 3: Einfluss von Leptin und Statinen auf die Proliferation von Endothelzellen

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin; ## $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin;

** $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin ; n = 32

Leptin 8 ng/ml; Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$; Fluvastatin und Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$

3.1.2 Modulation des Statineffekts durch Metabolite des Cholesterinstoffwechsels

Bisher konnten wir feststellen, dass Statine den Effekt von Leptin auf die endotheliale Proliferation inhibieren. Nun stellte sich die Frage, ob der Effekt der Statine auf die Inhibition der Cholesterinbiosynthese zurückzuführen ist oder auf eine Modulation der Prenylierung.

Mevalonat, F-PP und GG-PP sind unterschiedliche Metabolite der Cholesterinbiosynthese. Sie werden in weiteren Versuchen mit den Hauptstimulantien Leptin und den ausgewählten Statinen in Koinkubation untersucht.

Durch die Zugabe von Mevalonat konnte der antiproliferative Effekt von Cerivastatin aufgehoben werden, die alleinige Gabe von Mevalonat übte keinen Effekt auf die Proliferation aus (Abb. 4).

Das Farnesylpyrophosphat (F-PP) ist, wie in 1.3 beschrieben, ein aus Mevalonat synthetisiertes Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese, das für die Isoprenylierung verschiedener membrangebundener Proteine benötigt wird. Diese, wie beispielsweise Ras, werden für die Regulation der Zellteilung benötigt. Mit dem folgenden Experiment wurde festgestellt, dass durch die Zugabe von F-PP in das Kulturmedium auch die Wirkung der Statine signifikant reduziert werden konnte. Das Resultat zeigte, dass das endotheliale Zellwachstum im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Cerivastatin von 2,3% auf 39,4% weniger inhibiert wurde.

Geranylgeranylpyrophosphat (GG-PP) wird, wie in 1.3 beschrieben, aus F-PP gebildet und wird wie dieses für die Isoprenylierung membrangebundener Proteine benötigt, die an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind. Auch die Kostimulation von GG-PP und den Statinen reduzierte den inhibierenden Statineffekt signifikant.

Cerivastatin wird durch die Zugabe von GG-PP im endothelialen Zellwachstum von 2,3% auf 49,1% inhibiert. Die mit Fluvastatin und Simvastatin durchgeführten Versuche konnten diese Ergebnisse bestätigen. Die Abbildungen 3 und 4 fassen diese Ergebnisse zusammen.

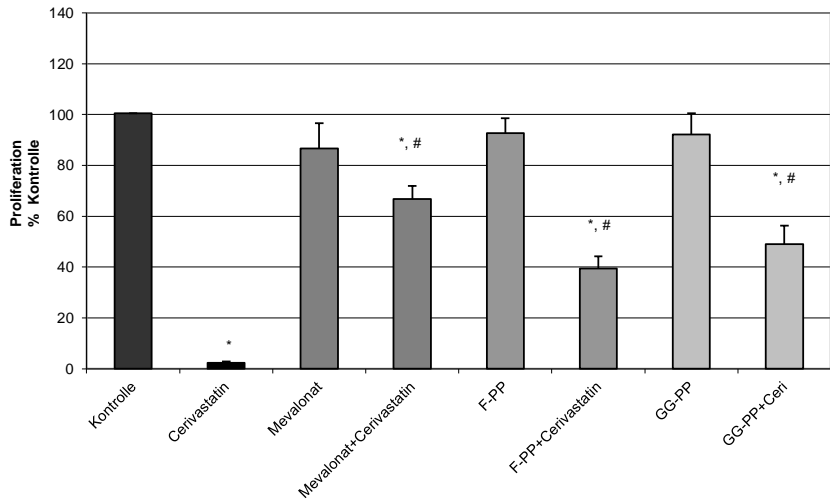


Abb. 4: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf Cerivastatin

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs Cerivastatin, $n = 32$

Cerivastatin $0,01 \mu\text{mol/l}$; Mevalonat $500 \mu\text{mol/l}$; F-PP 2 mmol/l ; GG-PP $2,2 \text{ mmol/l}$

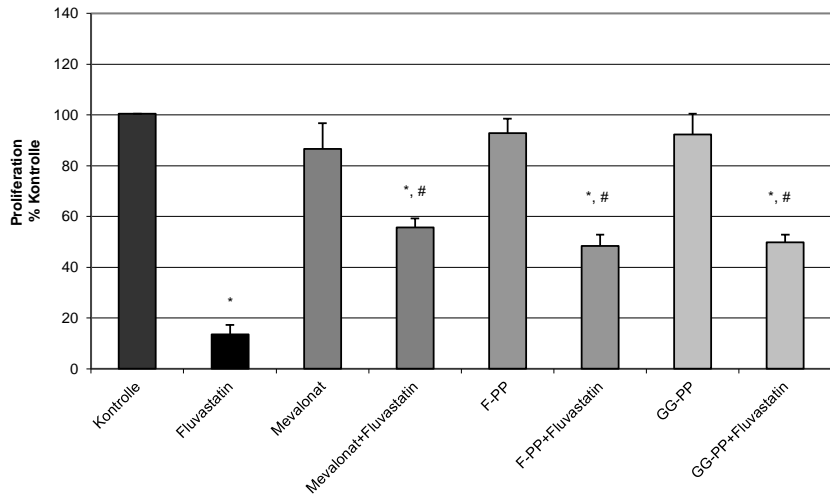


Abb. 5: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf Fluvastatin

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin, $n = 32$

Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$; Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$; F-PP 2 mmol/l ; GG-PP 2,2 mmol/l

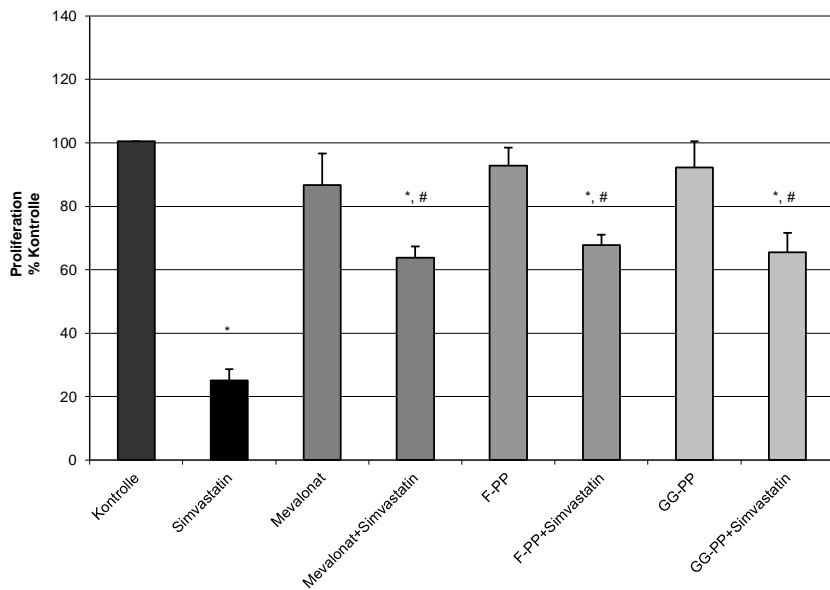


Abb. 6: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf Simvastatin

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angeführt.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin, $n = 32$

Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$; Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$; F-PP 2 mmol/l ; GG-PP 2,2 mmol/l

3.1.3 Einfluss von Statinen auf die Leptin-induzierte Proliferation

In den folgenden Experimenten versuchten wir herauszufinden, ob die Statine die Prenylierung über die Farnesylierung oder über die Geranylgeranylierung beeinflussen und so den Effekt von Leptin auf die Proliferation modulieren. Für dieses Experiment wurde das Zellwachstum von den hier verwendeten Statinen und Leptin, mit dem endothelialen Zellwachstum von den Statinen, Leptin in Kombination mit den Cholesterinmetaboliten verglichen. Wie Abbildung 7 zeigt, konnte der inhibierende Effekt von Cerivastatin sowohl durch die Zugabe von Mevalonat als auch durch F-PP und GG-PP signifikant antagonisiert werden. Dies konnte ebenfalls für Fluvastatin und Simvastatin gezeigt werden (Abb. 8 und 9). Bei Simvastatin antagonisiert GG-PP die Statin-induzierte Inhibition so stark, dass kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle hervorgerufen wird.

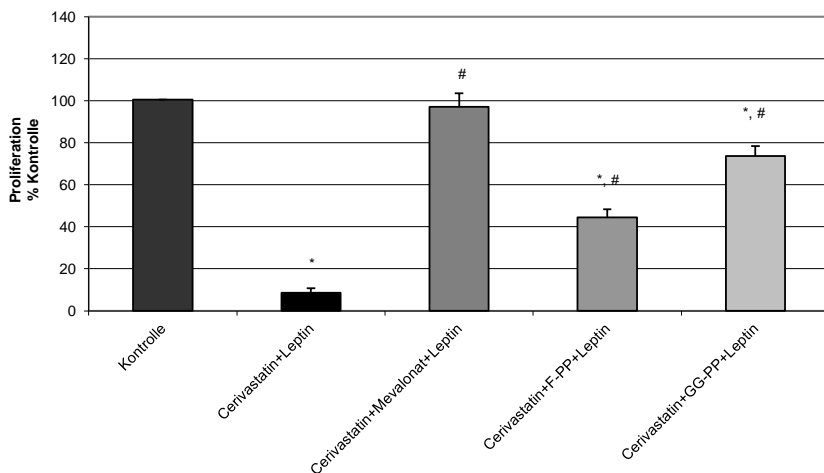


Abb. 7: Modulation der Leptin-induzierten Proliferation durch Cerivastatin und Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angeführt.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin + Leptin; n = 32

Leptin 8 ng/ml, Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

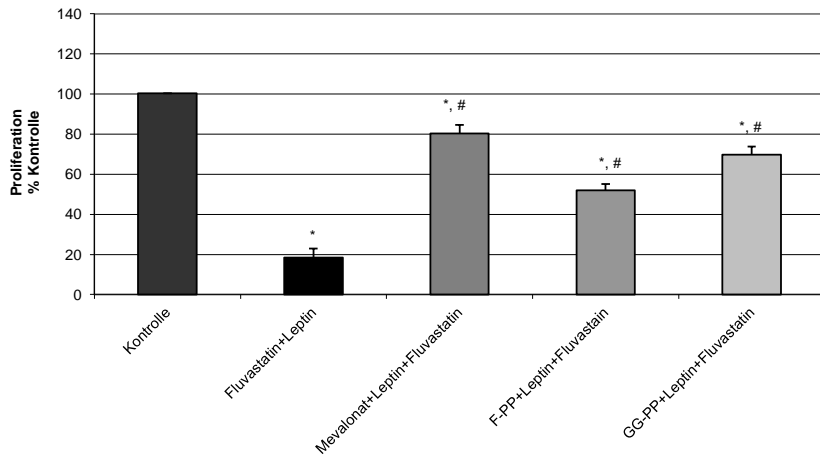


Abb. 8: Modulation der Leptin-induzierten Proliferation durch Fluvastatin und Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angeführt.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin + Leptin; n = 32

Leptin 8 ng/ml, Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

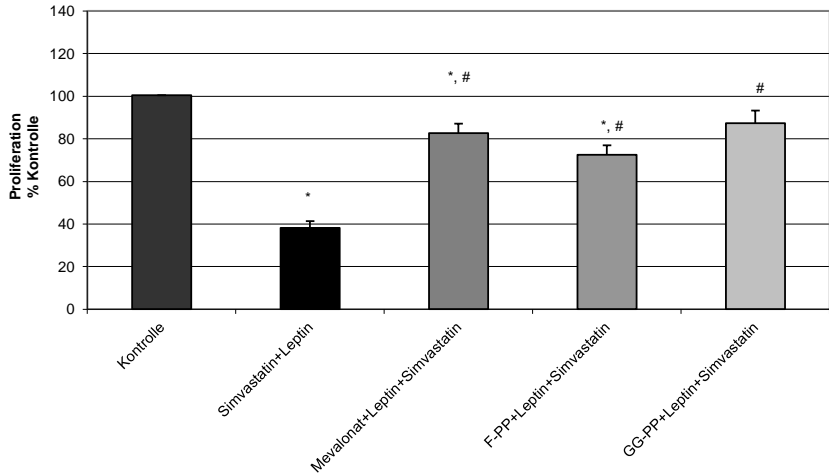


Abb. 9: Modulation der Leptin-induzierten Proliferation durch Simvastatin und Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angeführt.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin + Leptin; $n = 32$

Leptin 8 ng/ml, Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

3.2 Der planare Migrationsassay

3.2.1 Einfluss von Leptin, Fluva- und Simvastatin auf die Migration von Endothelzellen

Das Lipidhormon Leptin beeinflusst nicht nur die Proliferation, sondern induziert auch eine deutlich signifikante Steigerung der Migration auf 143,9%, im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Stimulation dieser Zellen mit Fluvastatin und Simvastatin führte zu einer signifikanten Inhibition der Zellwanderung. Fluvastatin erwies sich hier potenter, im Vergleich zu Simvastatin. Bei der Kostimulation sowohl mit Fluvastatin als auch mit Simvastatin wurde der Leptineffekt signifikant inhibiert (Abb. 10).

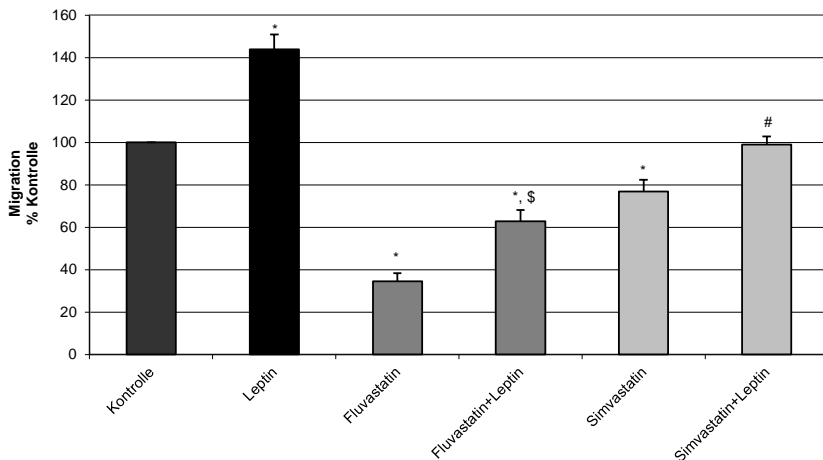


Abb. 10: Einfluss von Leptin, Fluvastatin und Simvastatin auf die Migration von Endothelzellen

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; \$ $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin; $n = 18$

Leptin 8 ng/ml, Fluvastatin 2 μ mol/l, Simvastatin 2 μ mol/l

3.2.2 Modulation des Statineffekts durch Metabolite des Cholesterinstoffwechsels

Wie auch schon in den Proliferationsexperimenten, zeigten die Statine einen signifikant inhibierenden Effekt auf die Migration. Die folgenden Versuche beschreiben, dass die inhibierende Wirkung von Fluvastatin durch Mevalonat, F-PP und GG-PP signifikant antagonisiert wurde.

Bei Simvastatin wurde der hemmende Effekt durch Mevalonat und GG-PP ebenfalls signifikant inhibiert. Auch die Kostimulation mit F-PP zeigte die gleiche Tendenz, das Signifikanzniveau wurde hierbei jedoch nicht erreicht (Abb.11).

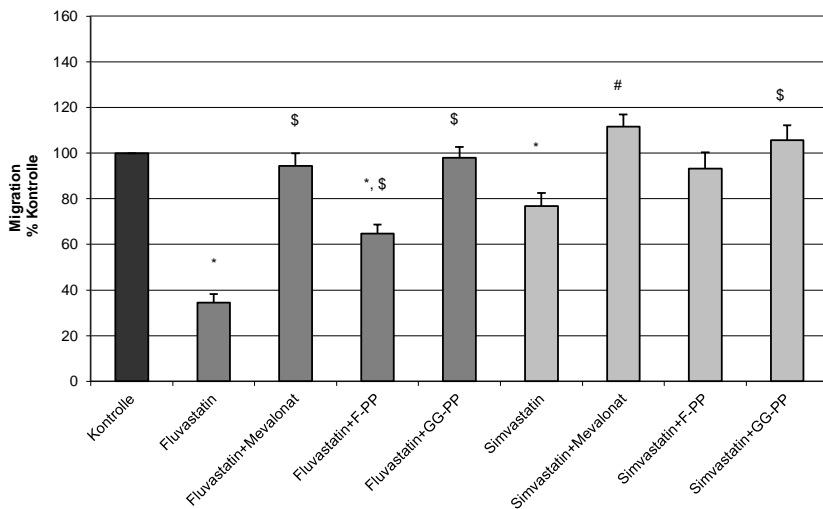


Abb. 11: Hemmung der Statinwirkung durch Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; \$ $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin; n = 18

Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$; Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l , GG-PP 2,2 mmol/l

3.2.3 Einfluss von Statinen und Cholesterinmetaboliten auf die Leptin-induzierte Migration

Die folgenden Experimente verbinden nun Leptin mit den Resultaten aus 3.2.2.

Zusammenfassend führte die Kostimulation von Statinen mit Mevalonat, F-PP und GG-PP jeweils zu einer signifikanten Inhibition des Statineffektes auf die Leptin-induzierte Migration. In den Abbildungen 12 und 13 sind die Ergebnisse in Diagrammform abgebildet.

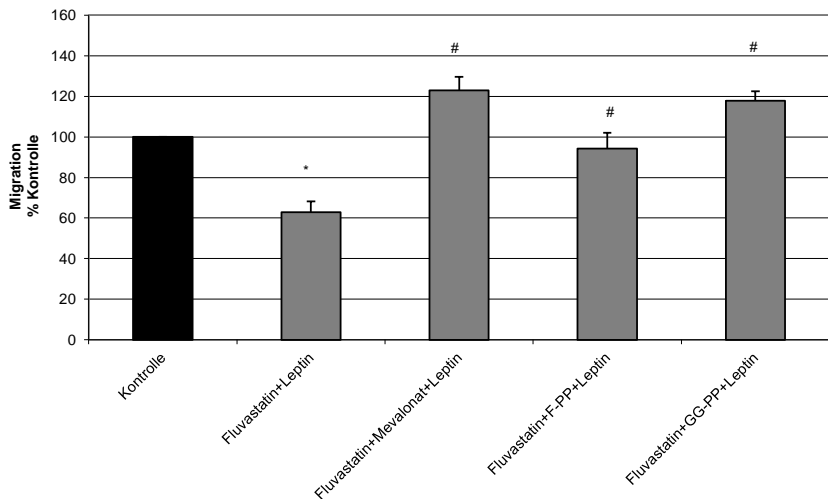


Abb. 12: Antagonisierung der Fluvastatinwirkung auf die Leptin-induzierte Migration durch Mevalonat, F-PP und GG-PP

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin + Leptin; n = 18

Leptin 8 ng/ml, Fluvastatin 2 μ mol/l, Mevalonat 500 μ mol/l, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

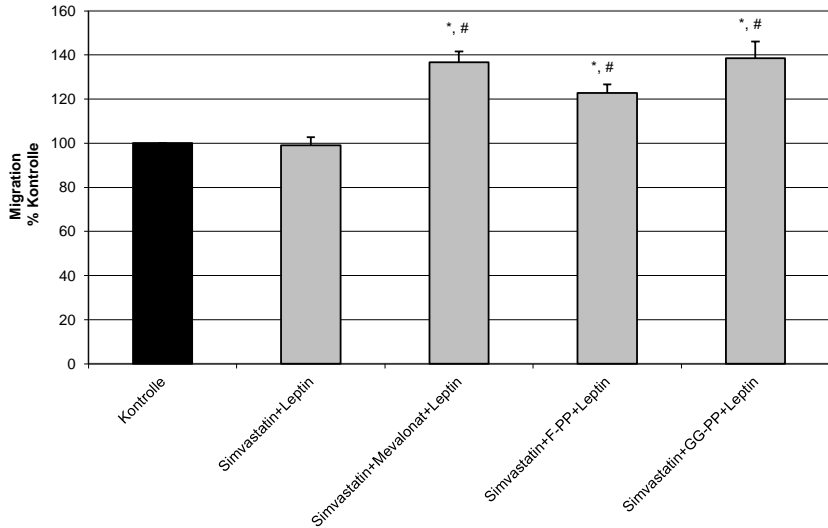


Abb. 13: Anatagonisierung der Simvastatinwirkung auf die Leptin-induzierte Migration durch Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM abgebildet.

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin + Leptin; n = 18

Leptin 8 ng/ml, Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

3.3 Dreidimensionaler Sphäroid-Angiogeneseassay

3.3.1 Einfluss der Statine auf die Leptin-induzierte Anzahl der Sphäroidsprossen

Bei dieser Versuchsreihe wurde untersucht, welchen Einfluss Leptin und die hierverwendeten Statine auf die *capillary like tube formation* Neubildung ausüben.

Die Stimulation mit Leptin zeigte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, keine signifikante Veränderung der Sprossenanzahl. Im Gegensatz zu der inhibierenden Wirkung von Statinen auf Migration und Proliferation steigerten die Statine die Bildung von *capillary like tube formation* (Gefäßneubildung). Die Stimulation mit beispielsweise Cerivastatin führte zu 19,9, im Vergleich zur Kontrolle, 5,1 Gefäßneuknospen. Die Kostimulationen der Statine mit Leptin führten nur bei der Stimulation mit Fluvastatin zu einer signifikanten Steigerung, im Vergleich zu alleinigen Statinstimulationen.

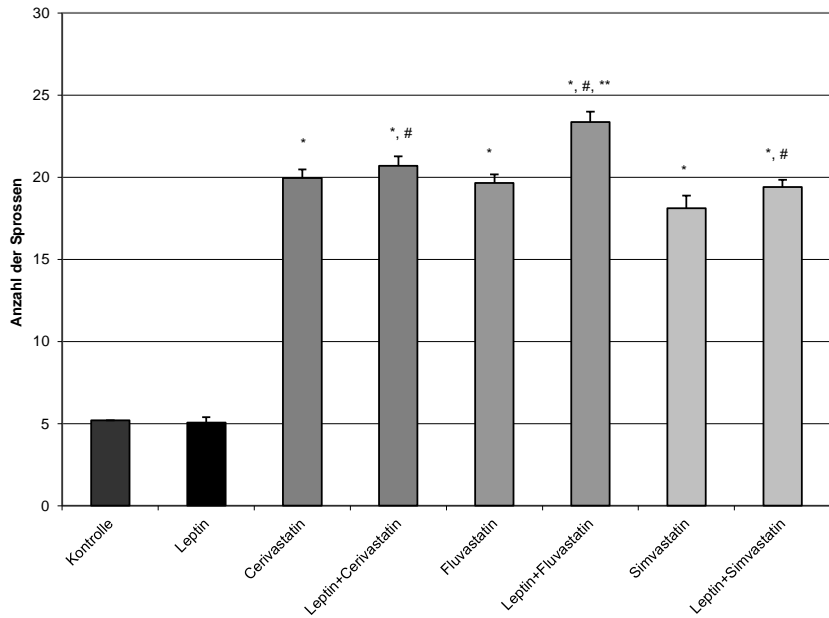


Abb. 14: Einfluss von Leptin auf die Statin-induzierten Sprossen

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; ** $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; $n = 20$

Cerivastatin $0,01 \mu\text{mol/l}$, Fluvastatin und Simvastatin $2 \mu\text{mol/l}$; Leptin 8 ng/ml

3.3.1.1 Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Statin-induzierte Gefäßneubildung

Die folgenden Experimente zeigen den Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Statin-induzierte Gefäßneubildung. Der fördernde Statineffekt auf die Gefäßneubildung wird durch Mevalonat, F-PP und GG-PP signifikant inhibiert (Abb. 15 - 17).

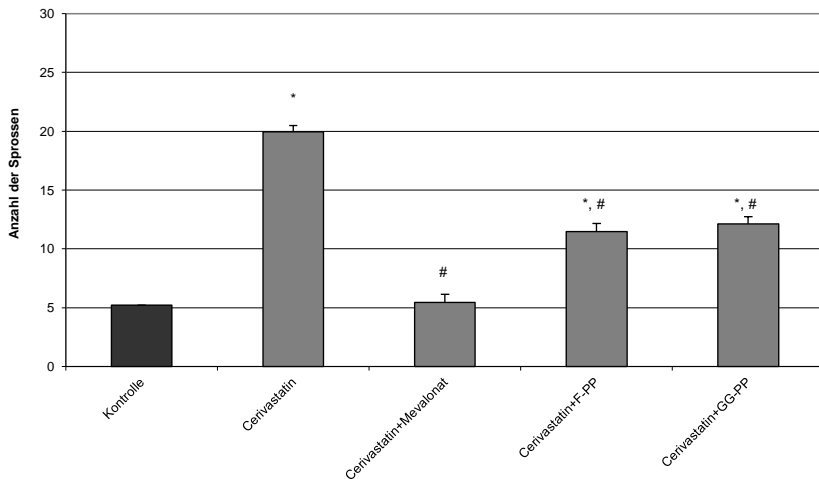


Abb. 15: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Cerivastatin-induzierte Gefäßneubildung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin; $n = 20$

Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$, Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l , GG-PP 2,2 mmol/l

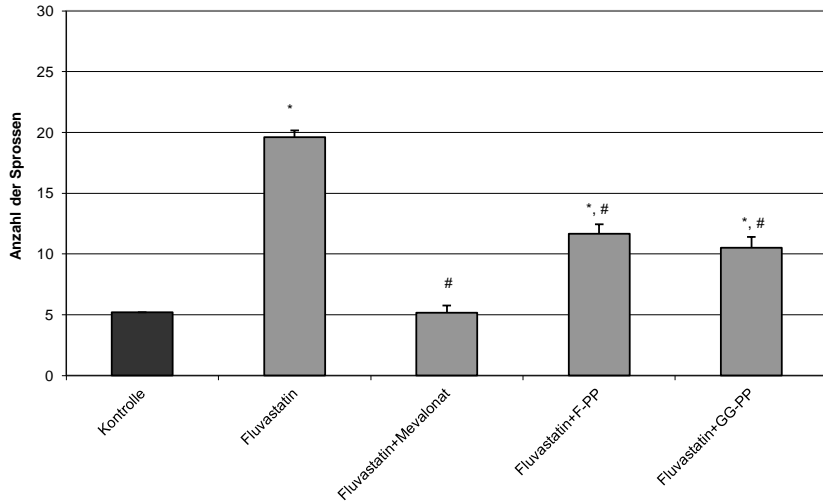


Abb. 16: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Fluvastatin-induzierte Gefäßneubildung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; $n = 20$

Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l , GG-PP 2,2 mmol/l

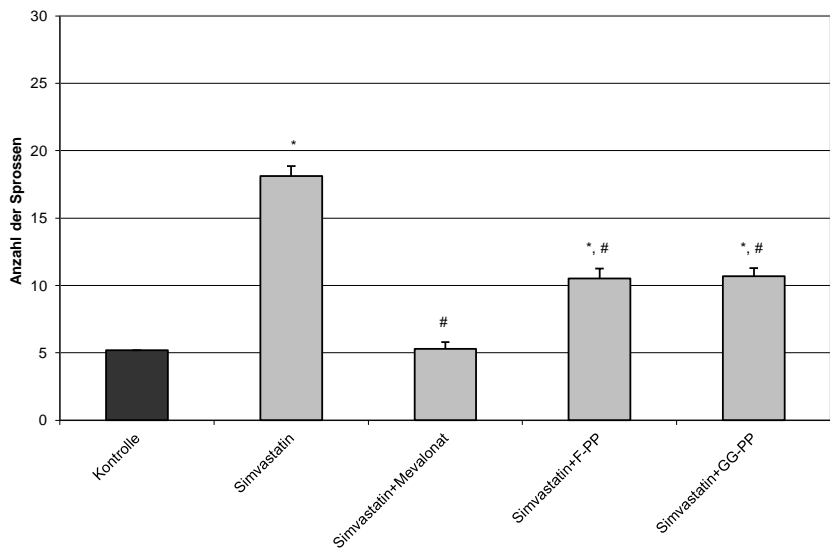


Abb. 17: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Simvastatin-induzierte Gefäßneubildung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin; n = 20

Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l , GG-PP 2,2 mmol/l

3.3.1.2 Modulation der Statin-induzierten Gefäßneubildung durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Tendenziell erreichte die Kostimulation mit Leptin, Statinen, F-PP und GG-PP eine Erhöhung der Sprossenanzahl, jedoch konnte nur für Cerivastatin und Fluvastatin in Kombination mit GG-PP eine signifikante Inhibition des Statineffekts durch Leptin erzielt werden (Abb. 18 - 20).

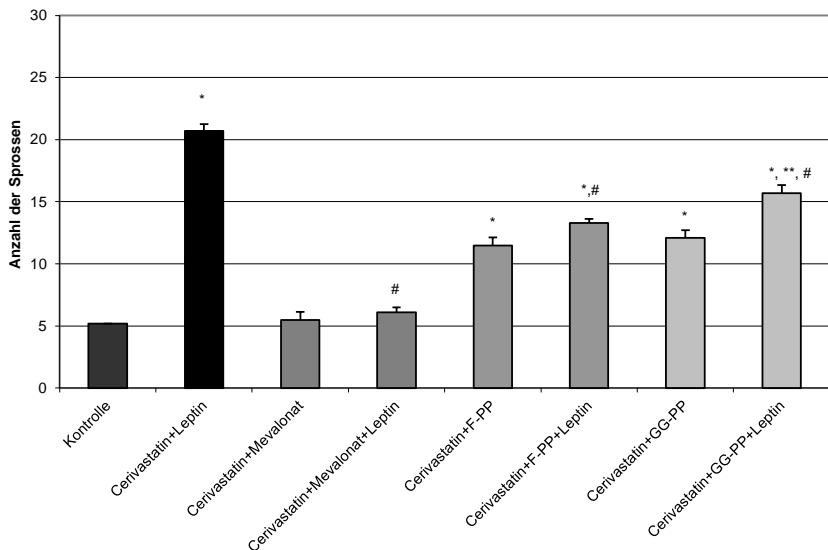
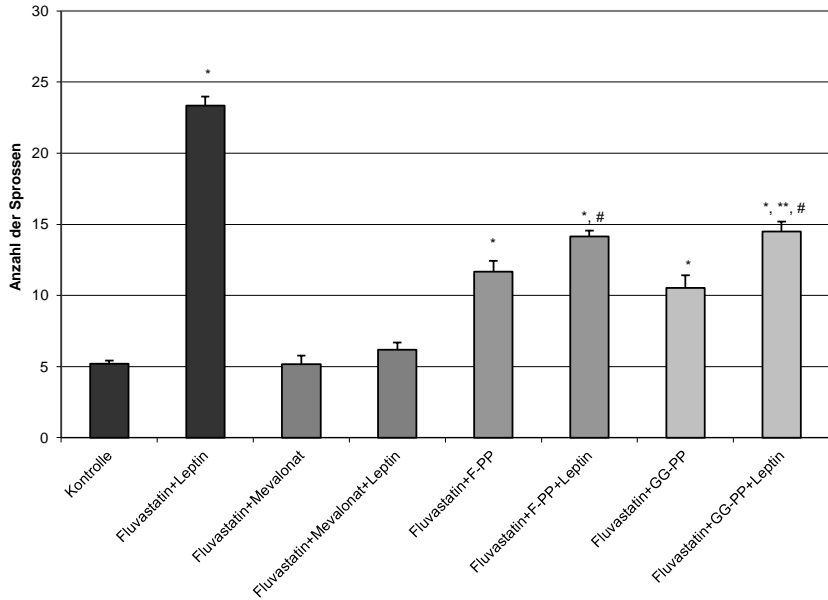


Abb. 18: Modulation der Cerivastatin-induzierten Gefäßneubildung durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + Leptin, ** $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin + GG-PP; n = 20

Leptin 8 ng/ml, Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$



**Abb. 19: Modulation der Fluvastatin-induzierten Gefäßneubildung durch Leptin:
Einfluss der Cholesterinmetabolite**

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $\leq 0,05$ vs. Fluvastatin + Leptin,

** $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin + GG-PP; n = 20

Leptin 8 ng/ml, Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$

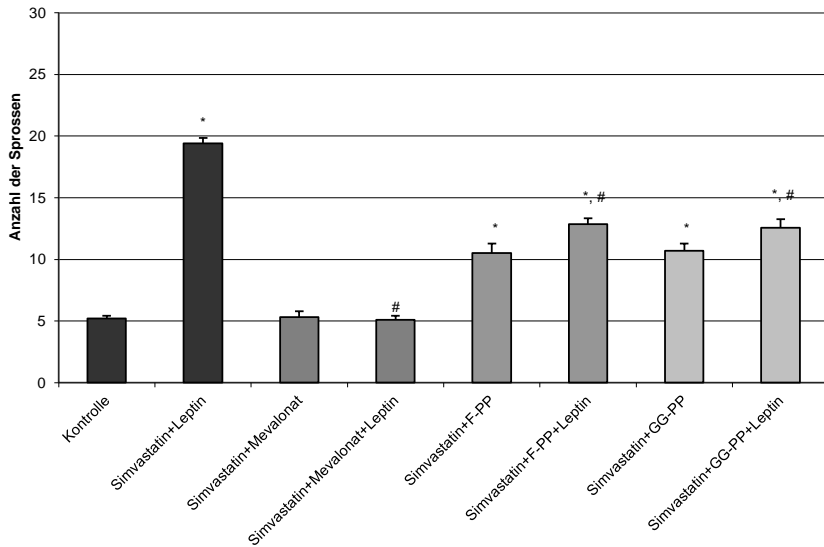


Abb. 20: Modulation der Simvastatin-induzierten Gefäßneubildung stimuliert durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $\leq 0,05$ vs. Simvastatin + Leptin; n = 20

Leptin 8 ng/ml, Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$

3.3.2 Einfluss von Leptin und Statinen auf die Sphäroidsprossenlänge

Die Leptinstimulation alleine induzierte keine signifikante Längenveränderung der Gefäßsprossen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Statine förderten signifikant das Längenwachstum der Sprossen. In der Kostimulation von Statinen und Leptin wurde der wachstumsverlängernde Effekt der jeweiligen Statine durch Leptin signifikant erhöht.

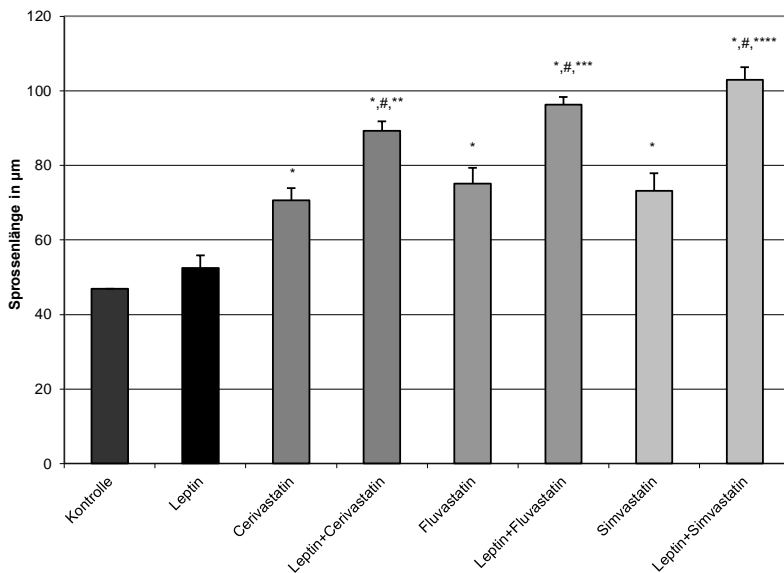


Abb. 21: Einfluss von Leptin und Statinen auf die Sprossenlänge

Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; ** $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin;

*** $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; **** $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin; n = 19

Cerivastatin 0,01 µmol/l, Fluvastatin und Simvastatin 2 µmol/l; Leptin 8 ng/ml

3.3.2.1 Einfluss der Cholesterinmetabolite auf das Statin-induzierte Längenwachstum

Die wachstumsfördernde Wirkung der Statine auf die Sprossenlänge wurde nun mit den Cholesterinmetaboliten inhibiert. Mevalonat zeigte eine signifikante Inhibition, F-PP und GG-PP zeigten gleiche Tendenzen, erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (Abb. 22 - 24).

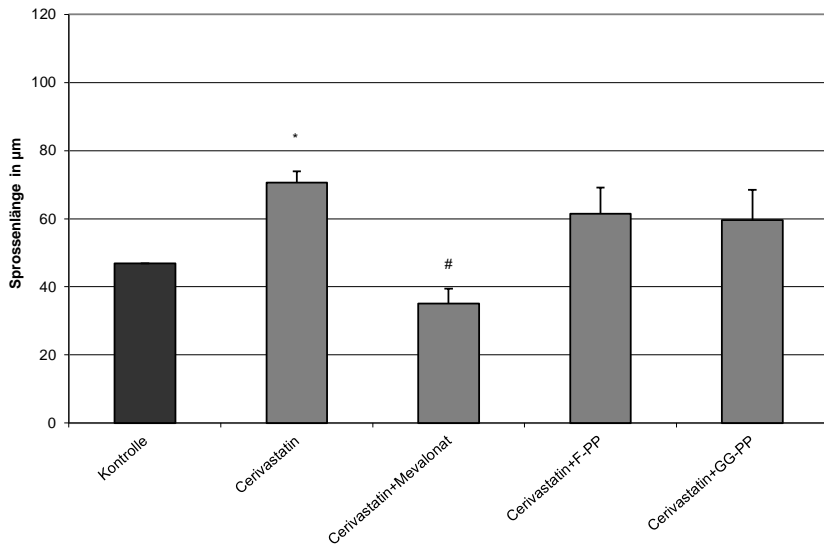


Abb. 22: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf das Cerivastatin-induzierte Längenwachstum

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin; $n = 19$

Leptin 8 ng/ml, Cerivastatin 0,01 µmol/l, Mevalonat 500 µmol/l, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

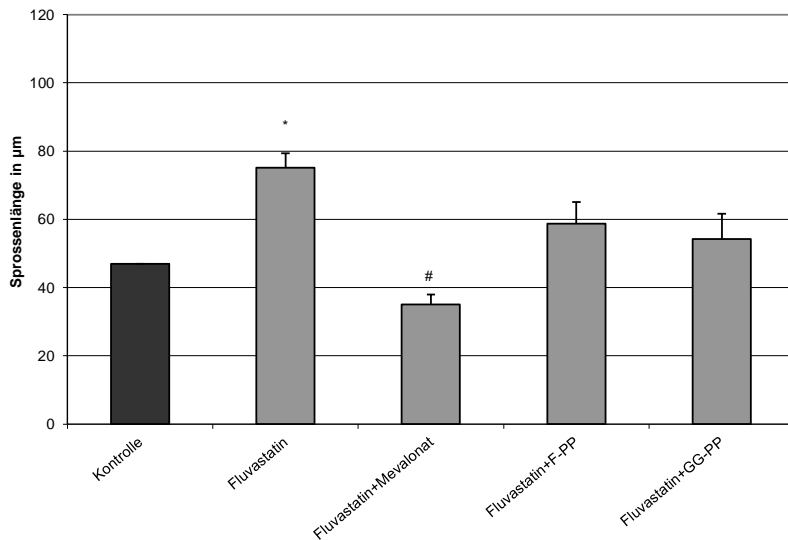


Abb. 23: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf das Fluvastatin-induzierte Längenwachstum

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; $n = 19$

Leptin 8 ng/ml, Fluvastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

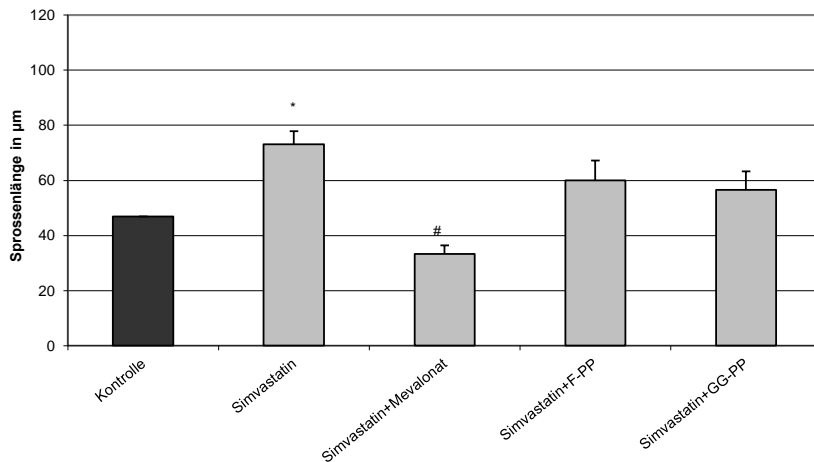


Abb. 24: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf das Simvastatin-induzierte Längenwachstum

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin; $n = 19$

Simvastatin 2 µmol/l, Mevalonat 500 µmol/l, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l

3.3.2.2 Modulation des Statin-induzierten Sprossen-Längenwachstums durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Der alleinige Wirkansatz mit Leptin führte weder in der Anzahl noch in der Länge zu einer signifikanten Veränderung der Sprossen. Die Kostimulation mit Leptin antagonisiert jedoch den inhibierenden Effekt der Cholesterinmetabolite auf die Statinwirkung (Abb. 25 -27).

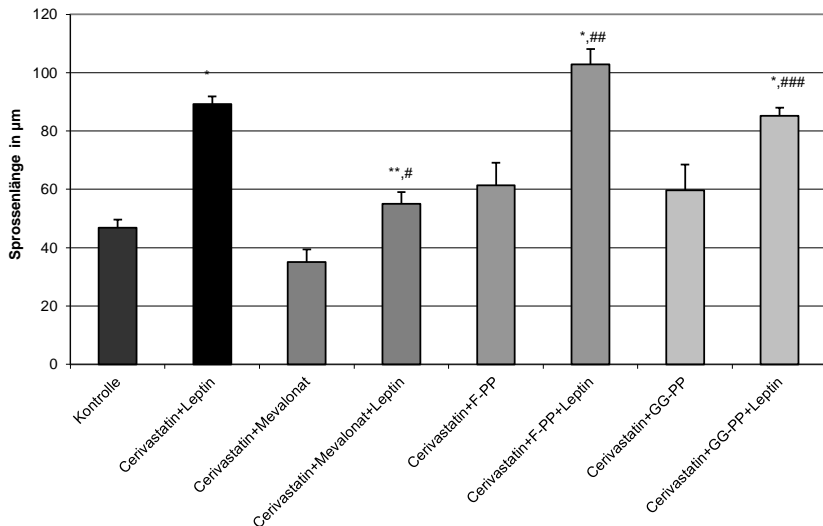


Abb. 25: Modulation des Cerivastatin-induzierten Sprossenlängenwachstums durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $\leq 0,05$ vs. Leptin + Cerivastatin; # $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + Mevalonat; ## $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + F-PP; ### $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + GG-PP; n=19

Leptin 8 ng/ml, Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$

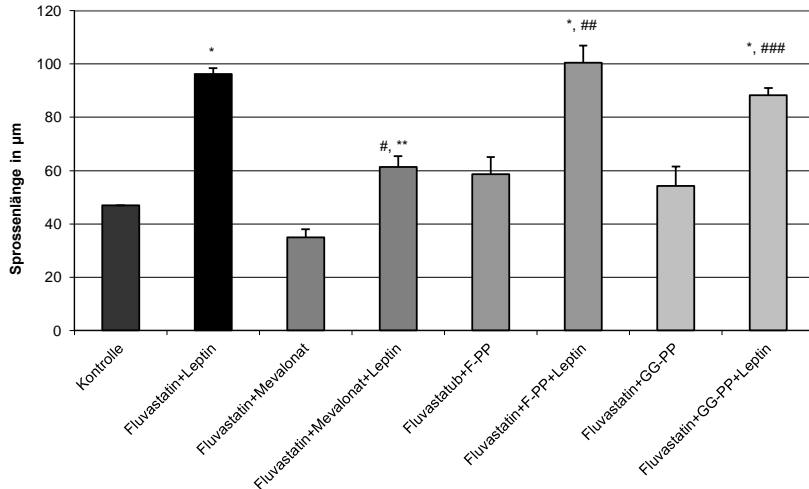


Abb. 26: Modulation des Fluvastatin-induzierten Sprossenlängenwachstums durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $\leq 0,05$ vs. Leptin + Fluvastatin; # $\leq 0,05$ vs. Fluvastatin + Mevalonat; ## $\leq 0,05$ vs. Fluvastatin + F-PP; ### $\leq 0,05$ vs. Fluvastatin + GG-PP; n = 19

Leptin 8 ng/ml, Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$

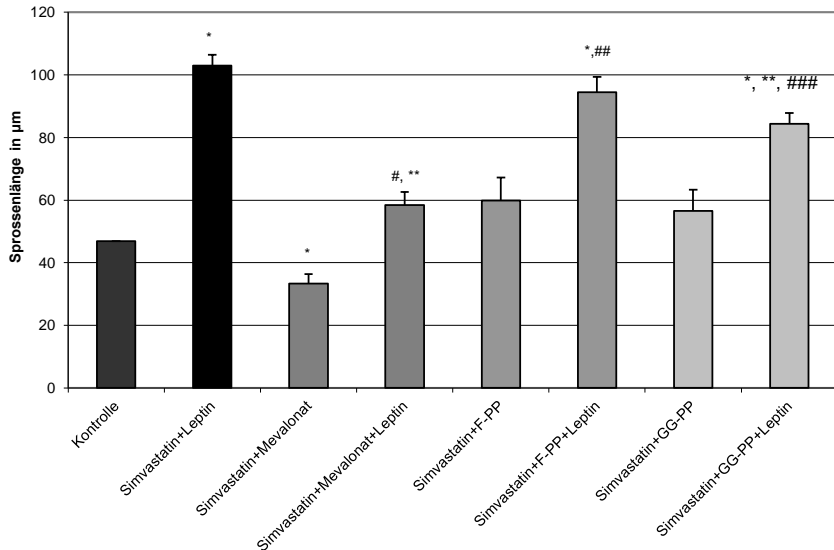


Abb. 27: Modulation des Simvastatin-induzierten Sprosslängenwachstums durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $\leq 0,05$ vs. Leptin + Simvastatin; # $\leq 0,05$ vs. Simvastatin + Mevalonat; ## $\leq 0,05$ vs. Simvastatin + F-PP; ### $\leq 0,05$ vs. Simvastatin + GG-PP; n = 19

Leptin 8 ng/ml, Simvastatin 2 µmol/l, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 µmol/l

3.3.3 Einfluss von Leptin, Cerivastatin, Fluvastatin und Simvastatin auf die kumulative Sprosslänge (KSL) der Sphäroide

Bei der Berechnung der KSL zeigte die Stimulation mit Leptin keinen Einfluss. Die Statine riefen eine signifikante Steigerung hervor, die Stimulation mit Leptin intensivierte diesen Effekt zusätzlich.

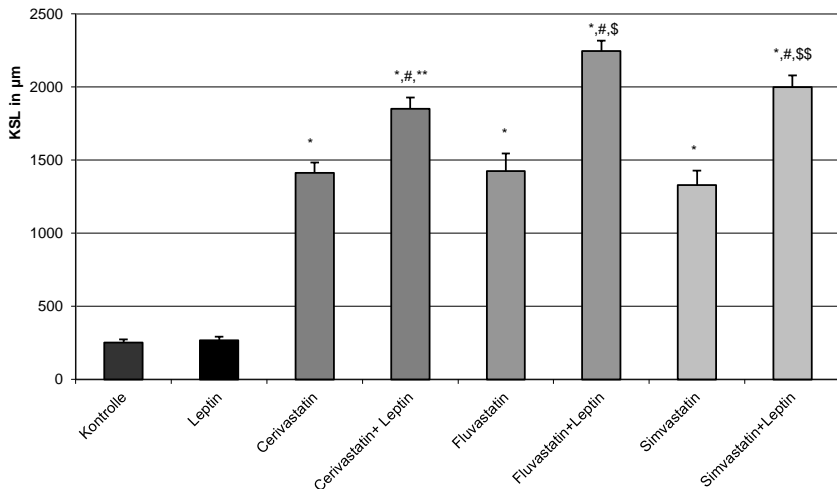


Abb. 28: Einfluss von Leptin und Statinen auf die kumulative Sprosslänge

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; ** $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin; \$ $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; \$\$ $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin; n = 9

Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$, Fluvastatin und Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$; Leptin 8ng/ml

3.3.3.1. Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Statin-induzierte KSL

Der Effekt der Statine auf die KSL wird durch Mevalonat, GG-PP und F-PP signifikant inhibiert (Abb. 29 – 31).

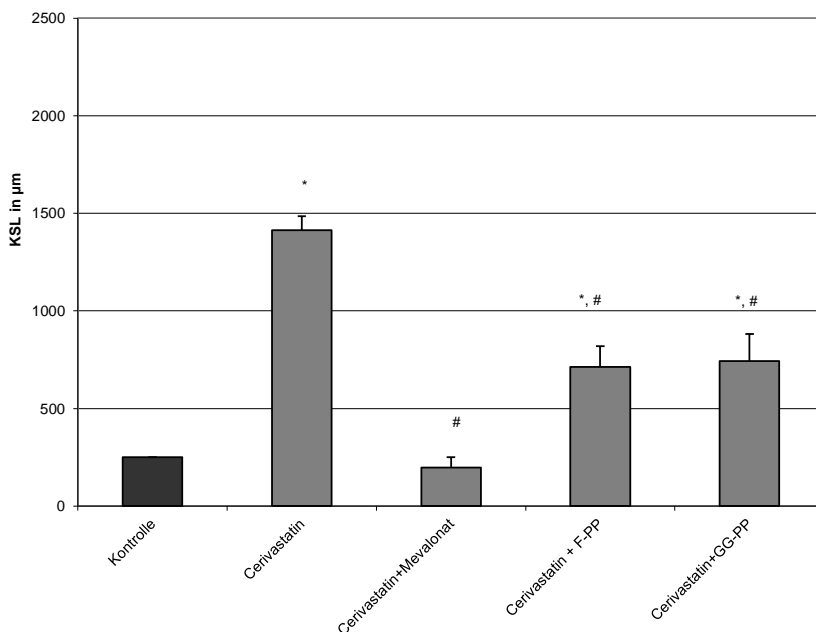


Abb. 29: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Cerivastatin-induzierte KSL

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Cerivastatin; $n = 20$

Cerivastatin $0,01 \mu\text{mol/l}$, Mevalonat $500 \mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l , GG-PP $2,2 \text{ mmol/l}$

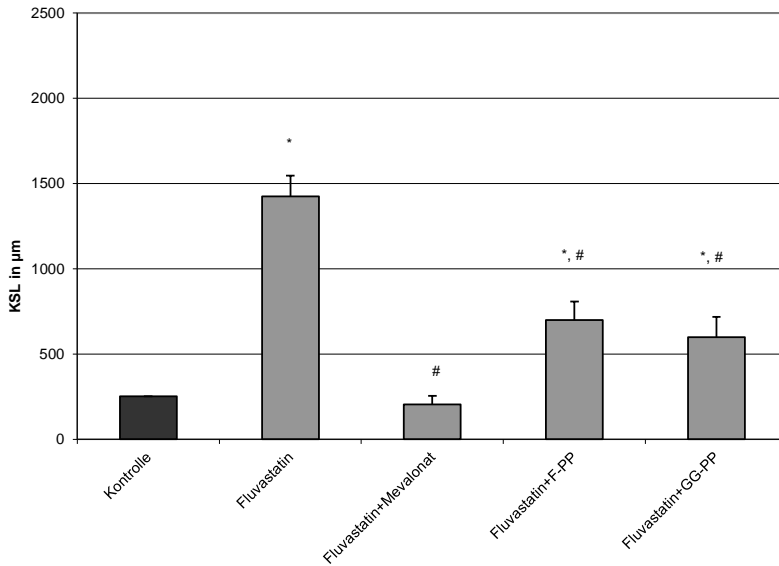


Abb. 30: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Fluvastatin-induzierte KSL

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Fluvastatin; $n = 20$

Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l , GG-PP 2,2 mmol/l

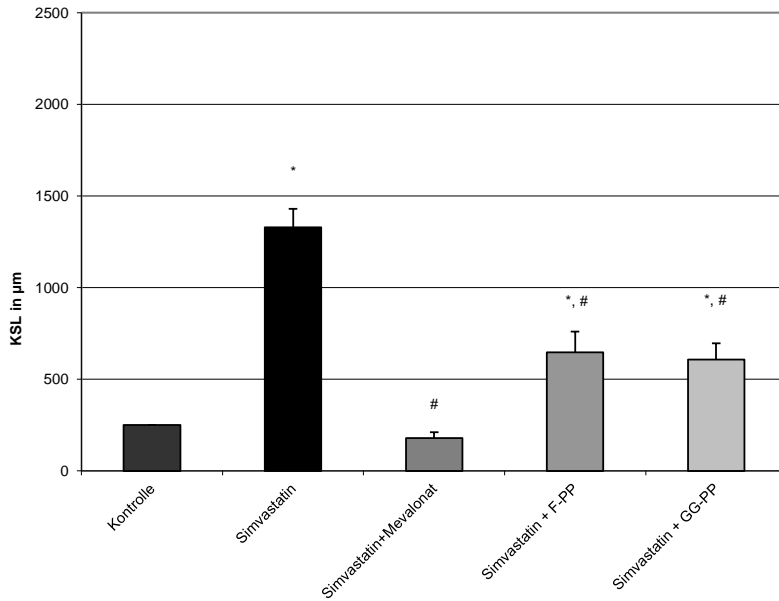


Abb. 31: Einfluss der Cholesterinmetabolite auf die Simvastatin-induzierte KSL

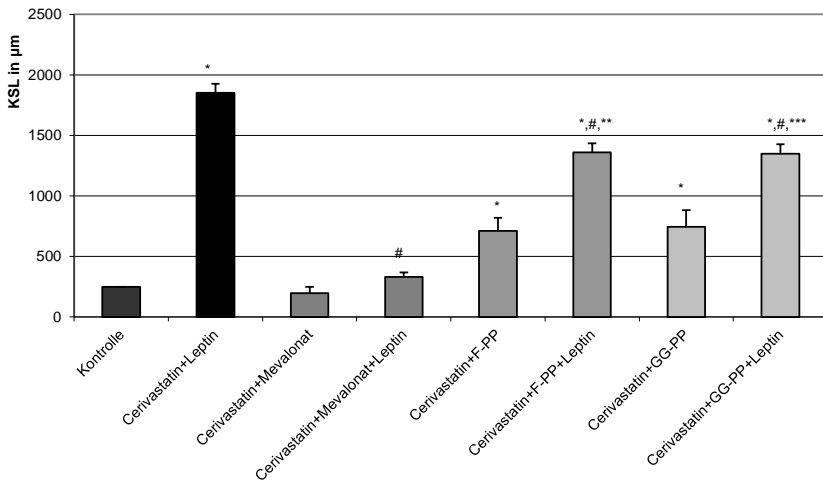
Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Simvastatin; $n = 20$

Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, Mevalonat 500 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l , GG-PP 2,2 mmol/l

3.3.3.2 Modulation der Statin-induzierten KSL durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetabolite

Leptin induzierte in Kostimulation mit dem jeweiligen Statin einen signifikanten Anstieg der KSL. Die Inhibition der Statinwirkung durch die Cholesterinmetabolite konnte durch Kostimulation mit Leptin bei allen Statinen stattfinden. In den F-PP und GG-PP Gruppen wurde die Statinwirkung signifikant inhibiert. In der Mevalonatgruppe wurde die gleiche Tendenz beschrieben, jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht.



**Abb. 32: Modulation der Cerivastatin-induzierten KSL durch Leptin:
Einfluss der Cholesterinmetabolite**

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + F-PP; # $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + Leptin; *** $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + GG-PP; n = 20

Leptin 8 ng/ml, Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 μmol

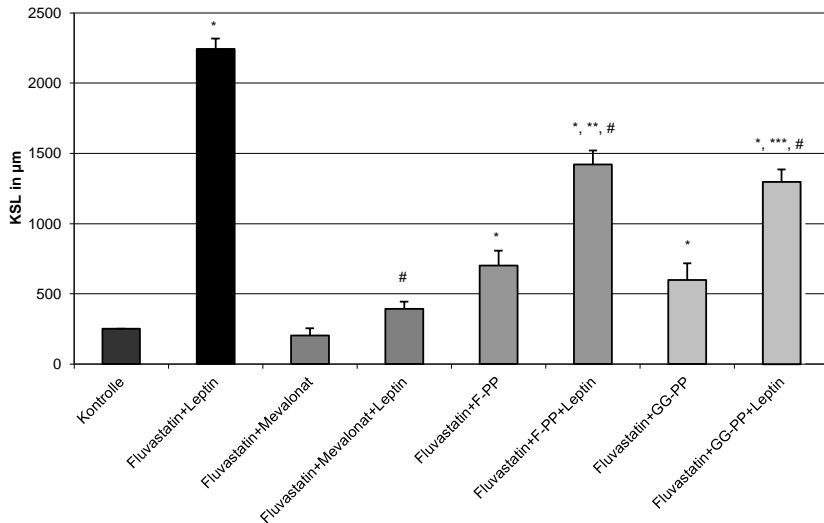


Abb. 33: Modulation der Fluvastatin-induzierten KSL durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetaboliten

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $\leq 0,05$ vs. Fluvastatin + F-PP; # $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + Leptin; *** $\leq 0,05$ vs. Fluvastatin + GG-PP; n = 20

Leptin 8 ng/ml, Fluvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 μmol

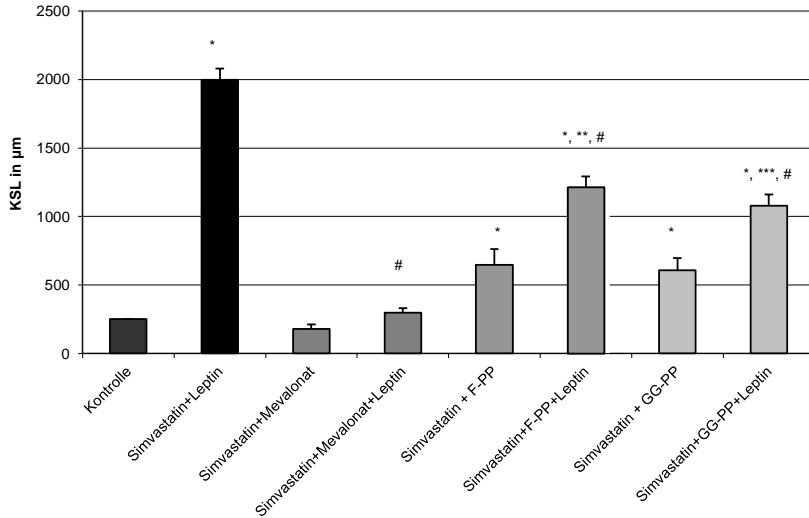


Abb. 34: Modulation der Simvastatin-induzierten KSL durch Leptin: Einfluss der Cholesterinmetaboliten

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ** $\leq 0,05$ vs. Simvastatin + F-PP; # $\leq 0,05$ vs. Simvastatin + Leptin; *** $\leq 0,05$ vs. Cerivastatin + GG-PP; n = 20

Leptin 8 ng/ml, Simvastatin 2 $\mu\text{mol/l}$, F-PP 2 mmol/l, GG-PP 2,2 mmol/l, Mevalonat 500 μmol

3.4 Einfluss einer membranösen Cholesterindepletion mittels MCD auf die endotheliale Proliferation und die *capillary like tube formation*

3.4.1 Einfluss von MCP auf die membranöse Proliferation

Im Vergleich zur Kontrolle reduzierte MCD die Proliferation signifikant, jedoch nicht so ausgeprägt wie die Statine. Die Leptin-induzierte Proliferation wurde durch MCD signifikant inhibiert (Abb. 35 - 37).

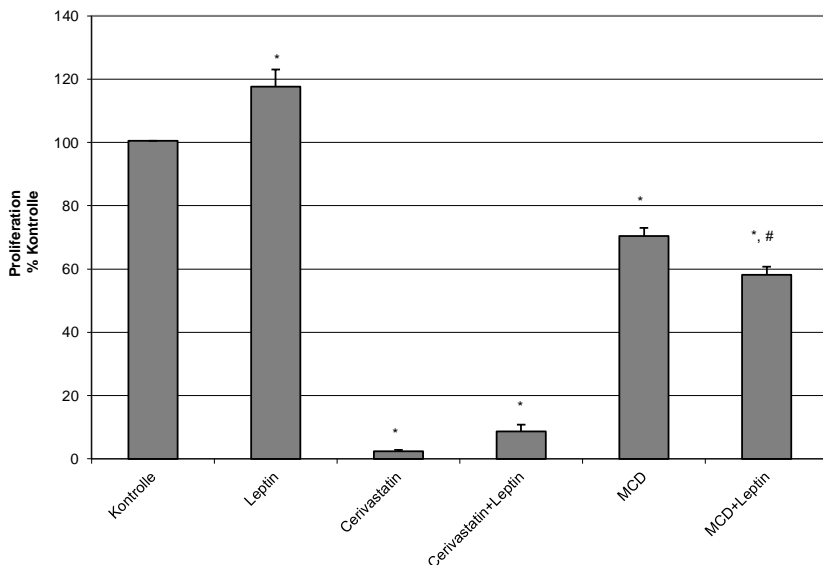


Abb. 35: Einfluss von MCD auf die endotheliale Proliferation im Vergleich zu Cerivastatin

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; $n = 24$

Leptin 8 ng/ml, Cerivastatin 0,01 $\mu\text{mol/l}$; MCD 10 mmol/l

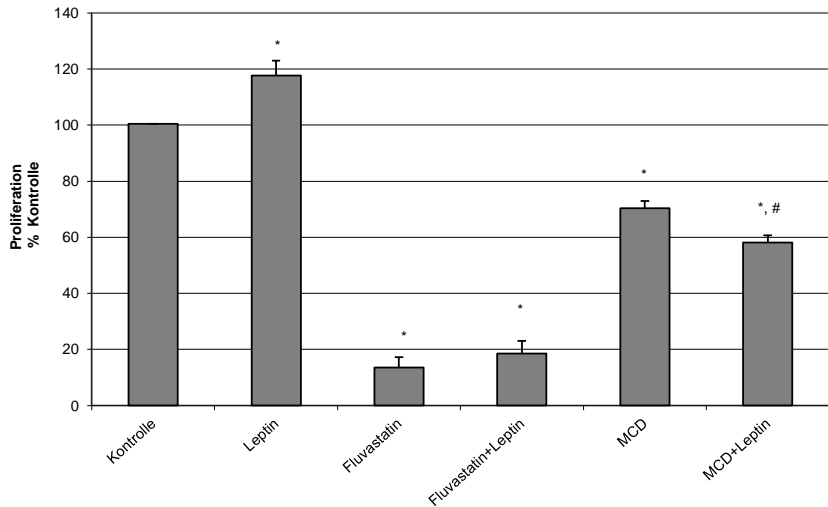


Abb. 36: Einfluss von MCD auf die endotheliale Proliferation im Vergleich zu Fluvastatin

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; n = 24

Leptin 8 ng/ml, Fluvastatin 2 μ mol/l; MCD 10 mmol/l

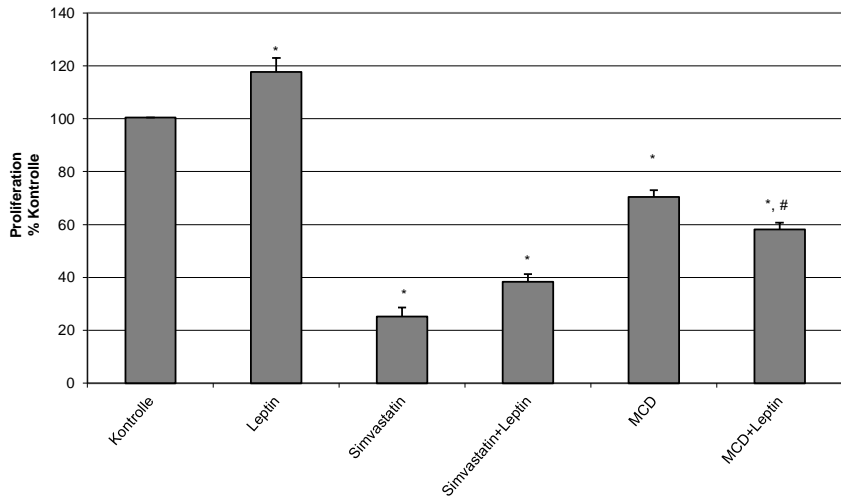


Abb. 37: Einfluss von MCD auf die endotheliale Proliferation im Vergleich zu Simvastatin

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; n = 24

Leptin 8 ng/ml, Simvastatin 2 μ mol/l; MCD 10 mmol/l

3.4.2 Einfluss von MCD auf die Anzahl der Sprossen

Im Vergleich zur Kontrolle führte MCD zu einer signifikanten Steigerung der Sprossenanzahl. Leptin hatte darauf keinen Einfluss (Abb. 38).

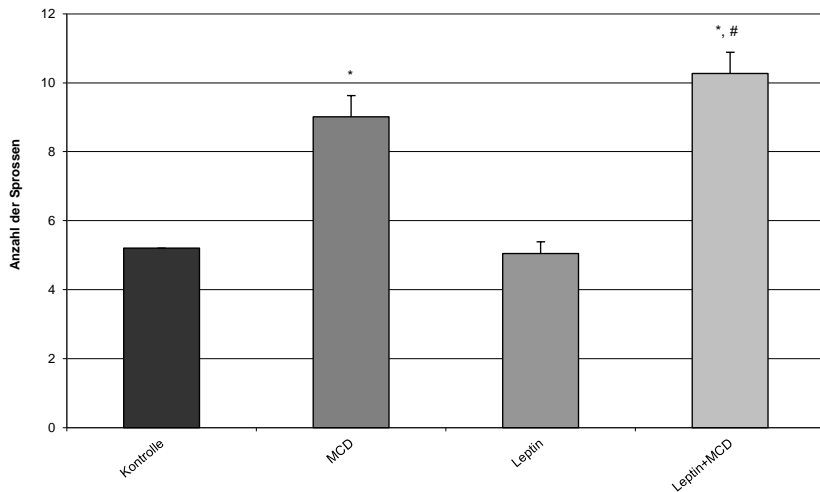


Abb. 38: Einfluss von MCD auf die Anzahl der Sprossen

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; $n = 24$

Leptin 8 ng/ml, MCD 10 mmol/l

3.4.3 Einfluss von MCD auf die Sprossenlänge

Im Vergleich zu Kontrolle fördert MCD das Längenwachstum der Sprossen signifikant, jedoch nicht so ausgeprägt wie die Statine. Im Gegensatz zum Einfluss auf die Statine, verstärkte Leptin die Wirkung von MCD auf das Sprossenlängenwachstum nicht.

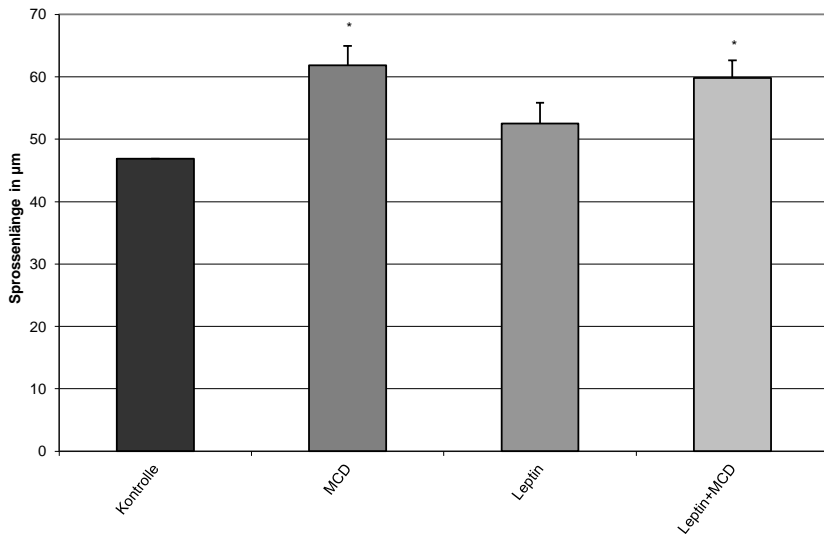


Abb. 39: Einfluss von MCD auf die Sprossenlänge

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; $n = 24$

Leptin 8 ng/ml, MCD 10 mmol/l

3.4.4 Einfluss von MCD auf die kumulative Sprossenlänge

MCD induzierte eine signifikante Steigerung der KSL, im Vergleich zur Kontrolle. Leptin verändert die Wirkung von MCD auf die KSL nicht.

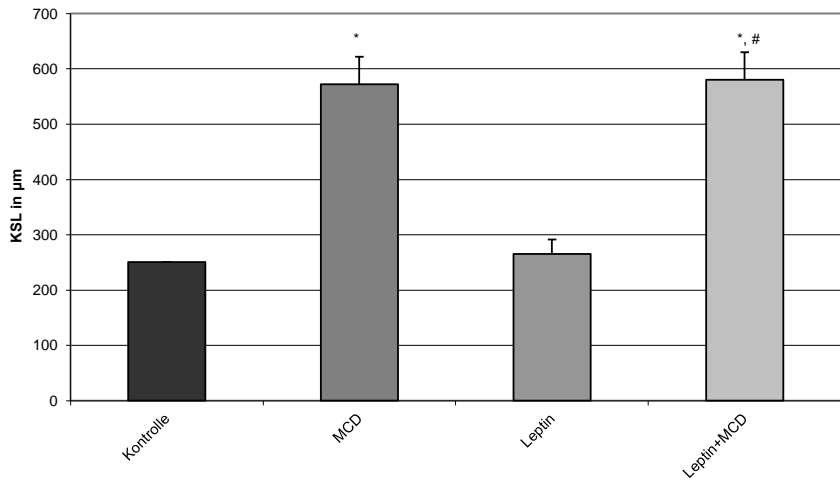


Abb. 40: KSL stimuliert von MCD, Leptin und Cerivastatin

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

* $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle, # $p \leq 0,05$ vs. Leptin; $n = 24$

Leptin 8 ng/ml, MCD 10 mmol/l

4 Diskussion

4.1 Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die Leptin-induzierte endotheliale Proliferation und Migration

Angiogenese, die Bildung neuer Gefäßstrukturen aus bereits vorhandenen Blutgefäßen, kann unter physiologischen Bedingungen, wie der Wundheilung und Revaskularisation, oder unter pathologischen Bedingungen, wie der Arteriosklerose und Malignomentstehung, eintreten. Sie ist ein regulierter Prozess der endothelialen Proliferation, Migration und Differenzierung. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten versuchen, die Inhibierung der Leptin-induzierten Angiogenese durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren weiter aufzuschlüsseln.

Bei der Entwicklung der Arteriosklerose handelt es sich, wie in 1.1 beschrieben, um ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren. Dass die durch Adipositas bedingte Hyperleptinämie fördernden Einfluss auf diesen Prozess nimmt, wurde in Kapitel 1.2 erörtert.

1998 erkannte die Arbeitsgruppe von *Sierra-Honigmann et al.*, dass Endothelzellen einen Leptinrezeptor aufweisen [77]. Außerdem ist bekannt, dass Hyperleptinämie die endotheliale Dysfunktion fördert und proarteriosklerotisch wirkt [36], [37], [78]. Bereits 2008 forderte *Dubey et al.* Plasmaleptin als nützlichen Risikomarker für koronare Herzerkrankungen [79].

In den Experimenten, die in Kapitel 3.1 vorgestellt wurden, konnte eine signifikante Steigerung der endothelialen Proliferation durch Leptin nachgewiesen werden. Hiermit konnten wir die Resultate anderer Arbeitsgruppen bestätigen [80], [43], [77], [44], [81]. Im Unterschied zu anderen Arbeitsgruppen konnten wir einen Leptineffekt bereits bei einer Dosis von 8 ng/ml nachweisen. Die Arbeitsgruppe von *Bouloumie et al.* benötigte eine Dosis von 10 ng/ml Leptin, um eine maximale Endothellzellproliferation zu erzielen [82].

Die Effekte von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wurden im Kapitel 1.3 ausführlich dargestellt. Unsere Resultate zeigten, dass die hier verwendeten Statine die endotheliale Proliferation signifikant inhibieren. Dies konnte auch *Zhang* 2008 beschreiben [83]. *Weiss et al.* stellte 2002 erstmals fest, dass Statine dosisabhängig Angiogenese beeinflussen. Mit einer *low-dose statin therapy* von 0,5 mg x kg(-1) x d(-1) wird die Proliferation, Migration und Differenzierung durch Statine gefördert. Ab 2,5 mg x kg (-1) x d(-1) hemmen Statine diese Prozesse [84]. Weitere Arbeitsgruppen bestätigten den biphasischen dosisabhängigen Statineffekt [85].

2009 beschrieb *Maeda et al.*, dass Simvastatin in der Lage ist, die Leptin-Expression in Adipozyten zu unterdrücken [86].

Wir konnten feststellen, dass die Leptin-induzierte Proliferation von Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle durch die hier verwendeten Statine signifikant inhibiert wird. Fluvastatin beispielsweise sorgte für eine Inhibition auf 18,4%.

Bei der durch Leptin stimulierten Migration wurde diese ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle durch Fluvastatin signifikant auf 62,8% inhibiert. Bei allen hier verwendeten Statinen konnte die signifikante Inhibition des Leptineffekts in den endothelialen Proliferations- und Migrationsexperimenten festgestellt werden. Eine völlige Aufhebung des Leptineffekts erreichten die Statine jedoch nicht.

Um diesen Effekt weiter zu untersuchen, mussten wir herausfinden, ob es sich bei diesen Ergebnissen um eine spezifische Statinwirkung handelte oder andere Mechanismen involviert waren. Da die HMG-CoA-Reduktase die Bildung von Mevalonat, einem Intermediat der Cholesterinbiosynthese, hemmt, wiederholten wir die durchgeführten Versuche unter Zugabe von Mevalonat. Der Statineffekt auf Proliferation und Migration konnte in dieser Versuchsreihe durch Mevalonat wieder aufgehoben werden.

Unsere Resultate zeigten, dass eine Statin-induzierte Inhibition der mitogenen Zellantwort durch die Applikation von Mevalonat reversibel war. Die alleinige Inkubation der Endothelzellen mit Mevalonat bewirkte kein verändertes Wachstum. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Leptin-Inhibition auf einem spezifischen Effekt der HMG-CoA-Reduktase basiert. Schon *Eccles et al.* nutzte 2008 in seinen Experimenten Mevalonat zur Überprüfung des Statineffekts [87]. 2009 antagonisierte auch *Dje N`Guessan et al.* die Statinwirkung durch Mevalonat und erkannte, dass die

Modifizierung von Histonen in Endothelzellen eine Rolle in der Entwicklung von Arteriosklerose spielt [88].

Zusammenfassend konnten wir durch diese Versuche zeigen, dass die Inhibierung der Leptin-induzierten Proliferation und Migration von Endothelzellen auf die HMG-CoA-Reduktase zurückzuführen ist.

Nun stellte sich die Frage, ob dieser Statineffekt auf die Inhibition der Cholesterinsynthese oder durch die Modulation der Prenylierung durch F-PP und bzw. oder GG-PP zustande kommt.

Die Mevalonsäure ist ein Vorläufermolekül phosphorylierter Isoprenoide, wie Geranylgeranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat, die als hydrophober Lipidanker für die posttranslationale Modifikation von Signaltransduktionsmolekülen benötigt werden, insbesondere für GTP-bindende Proteine wie Ras, Rho, Rac. Auf diesem Weg können diese Proteine sich in der Plasmamembran verankern und den Zellzyklus beeinflussen [45].

Da unter Statinwirkung die für die Membranlokalisation und Aktivität der GTPasen notwendige posttranslationale Modifikation ausbleibt, entsteht der antiproliferative Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren [96].

Rho, ein durch GG-PP prenyliertes G-Protein, aktiviert glatte Muskelzellen und inhibiert die endotheliale NO-Synthase. Es synthetisiert u.a. aus Arginin Stickstoffmonoxid (NO), welches eine Vasodilatation initiiert.

Die Reduktion der Isoprenoidmenge durch Statine führt konsekutiv zu einer Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion und wirkt somit vasoprotektiv [89], [90], [91], [92].

Korda et al. stellten 2008 fest, dass Leptin zwar eNOS Expression in HUVEC fördert, demgegenüber aber die intrazelluläre Verfügbarkeit von Arginin reduziert. Somit fördert Hyperleptinämie das Ungleichgewicht zwischen endothelialen NO und zytotoxischem ONOO⁻ und fördert so die endotheliale Dysfunktion [93]. *Heeba et al.* konstatierten, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren genau diese Disbalance antiarteriosklerotisch modulieren [61].

Unsere Experimente zeigten, dass die Statinwirkung auf Proliferation und Migration durch F-PP und GG-PP signifikant inhibiert wird. Weiterhin konnte dieser Effekt für

GG-PP auch in einer Kostimulation von Leptin und Statin gezeigt werden, für F-PP fanden sich gleiche Tendenzen, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

Somit konnten wir demonstrieren, dass die Modulation der Leptin-induzierten Proliferation durch Statine durch die Inhibition der Prenylierung mit Geranylgeranyl erfolgt.

In den Migrationsexperimenten modulierten die Statine die Leptin-stimulierten HUVEC über die F-PP und GG-PP Prenylierung signifikant. Daher konnten wir zeigen, dass der Statin-modulierende-Effekt auf die Leptinstimulation der HUVEC, sowohl über die Prenylierung mit GG-PP als auch mit F-PP die Migration beeinflusst.

In Genf konnten *Veillard* und seine Arbeitsgruppe feststellen, dass Statine über die Modulation der GG-PP Prenylierung diverse proarteriosklerotische Chemokine und deren Rezeptorenexpression in Endothelzellen und Makrophagen inhibiert [69]. Auch *Park et al.* beschrieben 2008, dass durch die proinflammatorischen Mediatoren, wie Tumornekrose Faktor (TNF)-alpha und Angiotensin II, die Monozytenadhäsion an Endothelzellen via GG-PP Prenylierung initiiert werden und diese durch Simvastatin inhibiert werden können [94].

4.2 Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibition auf die Leptin-induzierte *capillary like tube formation*

Die *capillary like tube formation* sind strukturierte, gefäßähnliche Strukturen; sie entsprechen eher einem organisierten Gefäßnetz und gehen somit über die initiale unstrukturierte Proliferation und Migration der Endothelzellen hinaus.

Im Unterschied zu den Ergebnissen der Migrations- und Proliferationsversuchen konnten wir bei einer Dosis von 8 ng/ml weder in Anzahl, Länge noch in kumulative Sprossenlänge einen signifikanten Leptineffekt nachweisen. Andere Arbeitsgruppen, wie die von *Bouloumie et al.*, erreichten in ihren *capillary like tube formation* Experimenten im Gegensatz zu den hier erhobenen Ergebnissen eine signifikante Leptin-induzierte Steigerung der Sprossenanzahl und -länge. Diese Ergebnisse erzielten sie erst durch weit höhere Leptin Konzentrationen von 100 ng/ml [82].

Interessanterweise erreichten alle hier verwendeten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren eine signifikante Steigerung der Sprossenzahl, -länge und KSL. Auch die Arbeitsgruppen von Kureishi *et al.* und Khaidakov *et al.* konnten ähnliche Ergebnisse für Simvastatin und Rosuvastatin zeigen [97], [98].

Zusammenfassend konnten die durchgeführten Versuche trotz des zuvor festgestellten Effekts auf Proliferation und Migration keinen signifikanten Einfluss von Leptin auf die *capillary like tube formation* nachweisen. Bei Koinkubation mit den Statinen zeigte sich eine Zunahme der gefäßähnlichen Sprossung in allen drei Untersuchungskriterien (Anzahl, Länge und KSL).

Da der Effekt der Statine durch die Zugabe von Mevalonat antagonisiert werden konnte, konnte auch dieser Effekt spezifisch auf die HMG-CoA-Reduktase zurückgeführt werden. Hierbei scheint die Prenylierung mit GG-PP in Teilen relevant, F-PP jedoch die wichtigste Rolle zu spielen.

Zusammenfassend kann anhand dieser Daten festgestellt werden, dass Statine Proliferation, Migration und *capillary like tube formation* durch Inhibition der Prenylierung mit GG-PP und F-PP modulieren.

Im Kontext der Arteriosklerose können diese Ergebnisse eine mögliche Erklärung für die plaquestabilisierende HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren-Wirkung darstellen.

Grundsätzlich wird unterschieden zwischen einer stabilen Plaque, die einen kleinen Kern mit geringem Lipidanteil, dicker fibröser Kappe, wenig Entzündungszellen, dichter extrazellulärer Matrix sowie einer qualitativen Gefäßstruktur besitzt, und einer instabilen Plaque mit großem Lipidkern, dünner fibröser Kappe, vielen Entzündungszellen, wenig glatten Muskelzellen und unreifen vaskulären Strukturen [99].

Mofidi *et al.* konstatierten 2001, dass die durch Endothelzellproliferation entstandenen neuen Gefäße fragil sind und zu Einblutungen in die Plaques führen können [100]. Diese Intraplaquehämmorrhagie führt zu einer Volumenzunahme der Plaques und macht sie so instabiler [101].

In verschiedenen klinischen Studien wurde bereits gezeigt, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren arteriosklerotische Plaques stabilisieren und die Progression der Arteriosklerose inhibieren [64], [102], [103].

Eine vulnerable arteriosklerotische Plaque ist durch vermindertes Kollagen und erhöhte Neovaskularisierung gekennzeichnet [104]. Dass Statine die Plaquestabilität durch direkte Hemmung der Expression proteolytischer Matrix-Metalloproteasen verbessern, konstatierten 2001 Aikawa *et al.* [105]. Wir konnten aufgrund der erhobenen Daten zeigen, dass sowohl die Förderung des qualitativ hochwertigen vaskulären Wachstums, als auch die Hemmung ungerichteter Proliferation und Migration durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die Inhibition der Prenylierung zurückzuführen ist. Die protektiven Effekte von Statinen in Bezug auf die Plaquestabilisierung ist jedoch nicht nur durch die Neovaskularisation bedingt, sondern auch durch die Inhibition der inflammatorischen Prozesse, Verminderung der Zelladhäsionen, Reduktion der Thrombogenität und durch die Lipidreduktion in Plaquekernen [96].

Ein weiteres Beispiel für die Statin-induzierte Ausbildung neuer *capillary like tube formations* stellten Masataka Sata *et al.* dar. Diese Arbeitsgruppe behandelte ischämische Beine von Mäusen mit Cerivastatin und konnte feststellen, dass diese einen deutlich verbesserten kollateralen Fluss nach akuter Ischämie zeigten [106].

Die hier erhobenen Ergebnisse, dass Statine Proliferation, Migration und *capillary like tube formation* durch Inhibition der Prenylierung modulieren, könnten auch die potentielle Rolle in der Statine in der Malignomtherapie erklären. Wachstum und die Ausbreitung eines Tumors sind u.a. von der Vaskularisation des Tumors abhängig. In Tierversuchen zeigt sich eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine Inhibition der Tumorstreuung bei einer Vielzahl von Malignomen, wie Melanom, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Fibrosarkom, Lymphom, Glio- und Neuroblastom [95]. 2010 bestätigten Wang *et al.* den antitumoralen und antiangiogenetischen Effekt von Rosuvastatin an Zebrafischen mit Prostatakarzinom [107]. Kürzlich erkannte eine texanischen Arbeitsgruppe von Mandal *et al.*, dass Simvastatin präventiv die Ausbildung von Knochenmetastasen beim Mammakarzinom inhibiert [108].

4.3 Auswirkungen der Cholesterindepletion aus der endothelialen Zellmembran

Um zu überprüfen, ob die gesehenen Effekte allein auf die der HMG-CoA-Reduktase nachgeschalteten Signaltransduktionen zurückzuführen sind, oder ob es sich auch um eine Reaktion auf die Cholesterindepletion aus der Zellmembran handelt, wurden die Versuchsreihen mit MCD unternommen. MCD ist, wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, ein Molekül, das selektiv Cholesterin aus Plasmamembranen entfernt [75] und somit einen essentiellen Bestandteil der *lipid rafts* zerstört [109]. Sie spielen eine zentrale Rolle in vielen verschiedenen zellulären Prozessen, vor allem in der Signaltransduktion, Transzytose und als Pforte für Krankheitserreger [72], [73], [74].

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Cholesterindepletion aus der endothelialen Plasmamembran einen signifikant inhibierenden Einfluss auf die Leptin-induzierte Proliferation nimmt, jedoch nicht an die inhibierende Wirkkraft der Statine heran reicht. In den Sproutexperimenten zur *capillary like tube formation* konnte durch MCD eine Verstärkung der Sprossenzahl, -länge und KSL gezeigt werden, jedoch nicht so ausgeprägt wie durch die Statine. Die Kostimulation mit Leptin hatte darauf keinen signifikanten Einfluss. Letztlich konnten wir zeigen, dass die Leptin-induzierte Proliferation und *capillary like tube formation* nicht hauptsächlich durch die MCD-induzierte Cholesterindepletion in der endothelialen Zellmembran beeinflusst wird, sondern durch die intrazelluläre Signaltransduktion durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Anfangs vermuteten wir einen Zusammenhang zwischen dem Leptinrezeptor und den *lipid rafts*. Diese Experimente zeigten jedoch, dass auch ohne funktionelle *lipid rafts* ein Leptineffekt in den HUVEC ausgelöst wird.

Zeidan et al. veröffentlichten 2008, dass die Hypertrophie von Kardiomyozyten durch Leptin positiv beeinflusst wird und dieser Signaltransduktionsweg mit Caveolen, eine Untergruppe der *lipid rafts*, im Zusammenhang steht [110].

Lipid rafts und ihre Funktionen in ihren zellulären Signaltransduktionen sind noch nicht ausreichend erforscht und bieten noch viele Möglichkeiten für weitere Versuchsreihen.

4.4 Klinische Aspekte und Schlussfolgerungen

Aus den gewonnenen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse auf das Krankheitsbild der Arteriosklerose ziehen:

Multifaktorielle Aspekte wie Dyslipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Inflammation und Hypertonie begünstigen die endotheliale Dysfunktion, die erheblichen Einfluss auf die Arterioskleroseentwicklung ausübt. Hyperleptinämie nimmt durch die Förderung der endothelialen Proliferation und Migration entscheidenden Einfluss auf die Progression der Arteriosklerose. Unsere Resultate zeigen, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren nicht nur durch die Senkung des LDL-Cholesterinspiegels protektiven Einfluss auf das arteriosklerotische Geschehen ausüben, sondern auch aufgrund ihrer pleiotropen Effekte dieses positiv beeinflussen. Im Kontext dieser Arbeit inhibierten Statine signifikant die Leptin-induzierte Proliferation und Migration durch Modifizierung der Prenylierung von Signalmolekülen mit Geranylgeranylphyrophosphat und Farnesylphyrophosphat. Somit haben sie einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung unreifer, vaskulärer Strukturen, die Plaquestabilität fördern. Wiederum stimulieren sie die Ausbildung qualitativ hochwertiger Gefäßstrukturen, wie den *capillary like tube formations*, und steigern auf diesem Weg die Plaquestabilität.

Zusammenfassend kann durch die hier erhobenen Resultate gezeigt werden, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Leptin-induzierte proarteriosklerotische Wirkung signifikant reduzieren.

Die erhobenen Daten sowie die derzeitig klinischen Therapiewirkungen durch Statine verstärken die Hypothese, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren ein innovatives, pharmakologisches Potential für die Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen besitzen. Statine senken damit das koronare Gesamtrisiko von Patienten. In Zukunft sollten weitere Studien zu einem noch besseren Verständnis für die pathophysiologischen Mechanismen der Artherogenese führen und die therapeutischen Möglichkeiten von Statinen auch für andere Krankheitsbilder, wie beispielsweise Tumorerkrankungen, nutzbar machen.

5 Literaturangaben

1. Gratzl, M., ed. *Histologie*. 2002, Springer Verlag.
2. Kreuzer, J., ed. *Atherosklerose*. 2003, Georg Thieme Verlag.
3. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. N Engl J Med, 1986. **314**(8): p. 488-500.
4. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
5. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
6. Drexler, H. and B. Hornig, *Endothelial dysfunction in human disease*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 51-60.
7. Silbernagel, S., ed. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. 2005, Georg Thieme Verlag.
8. Lüscher, T.F., *Vascular protection: current possibilities and future perspectives*. Int J Clin Pract Suppl, 2001(117): p. 3-6.
9. Allison, D.B., et al., *Annual deaths attributable to obesity in the United States*. Jama, 1999. **282**(16): p. 1530-8.
10. Mokdad, A.H., et al., *The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998*. Jama, 1999. **282**(16): p. 1519-22.
11. Ginsberg, H.N., *Insulin resistance and cardiovascular disease*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 453-8.
12. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
13. Löffler, ed. *Biochemie und Pathobiochemie*. 2003, Springer Verlag.
14. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 1078-81.
15. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
16. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
17. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
18. Stejskal, D., V. Ruzicka, and J. Bartek, *[Serum leptin, early atherosclerosis and hypolipidemia (a new, previously undescribed effect of pravastatin, a hypolipemic agent)]*. Vnitr Lek, 1998. **44**(10): p. 582-7.
19. Nicklas, B.J., et al., *Gender differences in the response of plasma leptin concentrations to weight loss in obese older individuals*. Obes Res, 1997. **5**(1): p. 62-8.
20. Bjorbaek, C., *Central leptin receptor action and resistance in obesity*. J Investig Med, 2009. **57**(7): p. 789-94.
21. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
22. Gannage-Yared, M.H., et al., *Serum adiponectin and leptin levels in relation to the metabolic syndrome, androgenic profile and somatotrophic axis in healthy non-diabetic elderly men*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**(1): p. 167-76.

23. Koerner, A., J. Kratzsch, and W. Kiess, *Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005. **19**(4): p. 525-46.
24. Parhami, F., et al., *Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin*. Circ Res, 2001. **88**(9): p. 954-60.
25. Cao, R., et al., *Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6390-5.
26. Oda, A., T. Taniguchi, and M. Yokoyama, *Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration*. Kobe J Med Sci, 2001. **47**(3): p. 141-50.
27. Matsumura, K., et al., *Central effects of leptin on cardiovascular and neurohormonal responses in conscious rabbits*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(5): p. R1314-20.
28. Schafer, K., et al., *Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 112-7.
29. Kougas, P., et al., *Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease*. J Surg Res, 2005. **126**(1): p. 121-9.
30. Knudson, J.D., et al., *Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H48-56.
31. Bodary, P.F., et al., *Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice*. JAMA, 2002. **287**(13): p. 1706-9.
32. Nakata, M., et al., *Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor*. Diabetes, 1999. **48**(2): p. 426-9.
33. Konstantinides, S., et al., *Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity*. J Clin Invest, 2001. **108**(10): p. 1533-40.
34. Loffreda, S., et al., *Leptin regulates proinflammatory immune responses*. Faseb J, 1998. **12**(1): p. 57-65.
35. Sommer, G., et al., *Secretory products from human adipocytes stimulate proinflammatory cytokine secretion from human endothelial cells*. J Cell Biochem, 2009. **106**(4): p. 729-37.
36. Knudson, J.D., et al., *Leptin and mechanisms of endothelial dysfunction and cardiovascular disease*. Curr Hypertens Rep, 2008. **10**(6): p. 434-9.
37. Rahmouni, K. and W.G. Haynes, *Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases*. Curr Diab Rep, 2005. **5**(4): p. 260-6.
38. Beltowski, J., *Leptin and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2006. **189**(1): p. 47-60.
39. Rahmouni, K. and W.G. Haynes, *Leptin and the cardiovascular system*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 225-44.
40. Wallace, A.M., et al., *Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS)*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3052-6.
41. Soderberg, S., et al., *Leptin is associated with increased risk of myocardial infarction*. J Intern Med, 1999. **246**(4): p. 409-18.
42. Schaefer, C.A., et al., *Statins inhibit hypoxia-induced endothelial proliferation by preventing calcium-induced ROS formation*. Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 290-6.

43. Park, H.Y., et al., *Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro*. Exp Mol Med, 2001. **33**(2): p. 95-102.
44. Goetze, S., et al., *Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands*. Hypertension, 2002. **40**(5): p. 748-54.
45. Löffler, ed. *Biochemie und Pathobiochemie*. Seite: 550.
46. Gupta, R., et al., *Body-mass index, waist-size, waist-hip ratio and cardiovascular risk factors in urban subejcts*. J Assoc Physicians India, 2007. **55**: p. 621-7.
47. Forth, H., Rummel, ed. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2001, Urban und Fischer.
48. Glomset, J.A., M.H. Gelb, and C.C. Farnsworth, *Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(4): p. 139-42.
49. Maltese, W.A., *Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells*. Faseb J, 1990. **4**(15): p. 3319-28.
50. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, *Rho GTPases and signaling networks*. Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
51. Laufs, U. and J.K. Liao, *Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 24266-71.
52. Cox, A.D. and C.J. Der, *Ras history: The saga continues*. Small Gtpases. **1**(1): p. 2-27.
53. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
54. <http://doc.rero.ch/record/20251?ln=de>.
55. Laufs, U., et al., *Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors*. Circulation, 1998. **97**(12): p. 1129-35.
56. Inoue, T. and K. Node, *Statin therapy for vascular failure*. Cardiovasc Drugs Ther, 2007. **21**(4): p. 281-95.
57. Liew, T.V. and K.K. Ray, *Intensive statin therapy in acute coronary syndromes*. Curr Atheroscler Rep, 2008. **10**(2): p. 158-63.
58. Balk, E.M., et al., *Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease: a systematic review*. Ann Intern Med, 2003. **139**(8): p. 670-82.
59. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
60. Calabro, P. and E.T. Yeh, *The pleiotropic effects of statins*. Curr Opin Cardiol, 2005. **20**(6): p. 541-6.
61. Heeba, G., et al., *Anti-atherogenic effect of statins: role of nitric oxide, peroxynitrite and haem oxygenase-1*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(8): p. 1256-66.
62. Settergren, M., et al., *Cholesterol lowering is more important than pleiotropic effects of statins for endothelial function in patients with dysglycaemia and coronary artery disease*. Eur Heart J, 2008. **29**(14): p. 1753-60.
63. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
64. Liao, J.K., *Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection*. Int J Cardiol, 2002. **86**(1): p. 5-18.

65. Rutishauser, J., *The role of statins in clinical medicine--LDL--cholesterol lowering and beyond*. Swiss Med Wkly, 2006. **136**(3-4): p. 41-9.
66. Yokoyama, K., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors suppress intracellular calcium mobilization and membrane current induced by lysophosphatidylcholine in endothelial cells*. Circulation, 2002. **105**(8): p. 962-7.
67. Nilius, B. and G. Droogmans, *Ion channels and their functional role in vascular endothelium*. Physiol Rev, 2001. **81**(4): p. 1415-59.
68. Dimitrova, Y., et al., *Effects of statins on adhesion molecule expression in endothelial cells*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(11): p. 2290-9.
69. Vincent, L., et al., *Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect*. FEBS Lett, 2001. **495**(3): p. 159-66.
70. Zhu, X.Y., et al., *Disparate effects of simvastatin on angiogenesis during hypoxia and inflammation*. Life Sci, 2008. **83**(23-24): p. 801-9.
71. Simons, K. and G. van Meer, *Lipid sorting in epithelial cells*. Biochemistry, 1988. **27**(17): p. 6197-202.
72. Barenholz, Y., *Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications*. Subcell Biochem, 2004. **37**: p. 167-215.
73. Simons, K. and R. Ehehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 597-603.
74. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
75. Rodal, S.K., et al., *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 961-74.
76. Korff, T. and H.G. Augustin, *Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation*. J Cell Biol, 1998. **143**(5): p. 1341-52.
77. Sierra-Honigsmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1683-6.
78. Bouloumie, A., et al., *Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells*. Faseb J, 1999. **13**(10): p. 1231-8.
79. Dubey, L., et al., *Potential role of adipocytokine leptin in acute coronary syndrome*. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2008. **16**(2): p. 124-8.
80. Garonna, E., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2 couples cyclooxygenase-2 with pro-angiogenic actions of leptin on human endothelial cells*. PLoS One. **6**(4): p. e18823.
81. Nath, A.K., et al., *Leptin affects endocardial cushion formation by modulating EMT and migration via Akt signaling cascades*. J Cell Biol, 2008. **181**(2): p. 367-80.
82. Bouloumie, A., et al., *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis*. Circ Res, 1998. **83**(10): p. 1059-66.
83. Zhang, S.Z., et al., *[Effects of three immunosuppressive agents and simvastatin on cell-proliferation and endothelin secretion of human endothelial cells]*. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 2008. **47**(6): p. 495-8.
84. Weis, M., et al., *Statins have biphasic effects on angiogenesis*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 739-45.
85. Katsumoto, M., et al., *Biphasic effect of HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin, on vascular endothelial cells and angiogenesis*. Circ J, 2005. **69**(12): p. 1547-55.

86. Maeda, T. and N. Horiuchi, *Simvastatin suppresses leptin expression in 3T3-L1 adipocytes via activation of the cyclic AMP-PKA pathway induced by inhibition of protein prenylation*. J Biochem, 2009. **145**(6): p. 771-81.
87. Eccles, K.A., et al., *Simvastatin alters human endothelial cell adhesion molecule expression and inhibits leukocyte adhesion under flow*. Atherosclerosis, 2008. **200**(1): p. 69-79.
88. Dje N'Guessan, P., et al., *Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(3): p. 380-6.
89. Rikitake, Y. and J.K. Liao, *Rho GTPases, statins, and nitric oxide*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1232-5.
90. Kumai, T., et al., *Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors: candidate mechanisms for anti-lipid deposition in blood vessels*. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2005. **3**(3): p. 195-201.
91. Forstermann, U., *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. Pflugers Arch. **459**(6): p. 923-39.
92. Ginter, E. and V. Simko, *Statins: the drugs for the 21st century?* Bratisl Lek Listy, 2009. **110**(10): p. 664-8.
93. Korda, M., et al., *Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(4): p. H1514-21.
94. Park, S.Y., et al., *Inhibitory effect of simvastatin on the TNF-alpha- and angiotensin II-induced monocyte adhesion to endothelial cells is mediated through the suppression of geranylgeranyl isoprenoid-dependent ROS generation*. Arch Pharm Res, 2008. **31**(2): p. 195-204.
95. Schmidt, *Non-lipid lowering effects of statins (in press)*. 2005.
96. Liao, J.K. and U. Laufs, *Pleiotropic effects of statins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 89-118.
97. Kureishi, Y., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals*. Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1004-10.
98. Khaidakov, M., et al., *Statins and angiogenesis: is it about connections?* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(3): p. 543-7.
99. Libby, P. and M. Aikawa, *Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1257-62.
100. Mofidi, R., et al., *Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease*. Br J Surg, 2001. **88**(7): p. 945-50.
101. Hayden, M.R. and S.C. Tyagi, *Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation*. Cardiovasc Diabetol, 2004. **3**: p. 1.
102. Vaughan, C.J., A.M. Gotto, Jr., and C.T. Basson, *The evolving role of statins in the management of atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(1): p. 1-10.
103. Waters, D.D., *What the statin trials have taught us*. Am J Cardiol, 2006. **98**(1): p. 129-34.
104. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. Circulation, 1995. **92**(3): p. 657-71.
105. Aikawa, M., et al., *An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro*. Circulation, 2001. **103**(2): p. 276-83.

106. Sata, M., et al., *Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia*. *FASEB J*, 2001. **15**(13): p. 2530-2.
107. Wang, C., et al., *Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer*. *Eur Urol*. **58**(3): p. 418-26.
108. Mandal, C.C., et al., *Simvastatin prevents skeletal metastasis of breast cancer by an antagonistic interplay between p53 and CD44*. *J Biol Chem*. **286**(13): p. 11314-27.
109. Kabouridis, P.S., et al., *Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(3): p. 954-63.
110. Zeidan, A., et al., *Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei*. *Cardiovasc Res*, 2008. **77**(1): p. 64-72.
111. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(11): p. 2745-56.

6 Anhang

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

7 Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Harald Tillmanns für die Möglichkeit am kardiologischen Institut der Justus Liebig Universität diese Arbeit durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Drs. med. Christian und Martina Schäfer für die Überlassung des Themas, sowie für die engagierte Unterstützung und Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen, die bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit mir mit Rat und Tat zur Seite standen, vor allem Ali Erdogan, Utz Benscheid, Clemens Leckband und die Mitarbeiter des kardiologischen und angiologischen Labors.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, ohne deren aufmunternde Unterstützung und Liebe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke meinen lieben Eltern, Schwester, Patentante und meinen geliebten Großeltern Marga und Heinrich Brustmeier.